

HUGO BRUNO CORREA MOLINARI

**EXPRESSÃO ESTRESSE-INDUZIDA DO GENE *P5CS* EM PLANTAS
TRANSGÊNICAS DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDAS AO DÉFICIT
HÍDRICO**

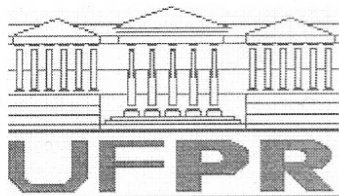
Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Edelclaiton Daros

Co-orientador: Dr. Luiz Gonzaga E. Vieira

CURITIBA

2006



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
PRODUÇÃO VEGETAL

PARECER


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO, apresentada pelo candidato **HUGO BRUNO CORREA MOLINARI**, sob o título "**EXPRESSÃO ESTRESSE-INDUZIDA DO GENE P5CS EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO**", para obtenção do grau de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Tese.

Curitiba, 15 de Maio de 2006.




Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira
Primeiro Examinador



Dr. Celso Jamil Mariz
Segundo Examinador



Professor Dr. João Carlos Bessai Filho
Terceiro Examinador



Professor Dr. José Luis Camargo Zambon
Quarto Examinador



Professor Dr. Edelclaiton Daros
Presidente da Banca e Orientador

À minha família, tão importante em todos os momentos da minha vida. Meus queridos pais Leny e Hugo e minhas irmãs Mayla Daiane e Leny Meire.

Ofereço.

À minha noiva Fabiana Manzato por todo amor, carinho, dedicação, compreensão, amizade e incentivo.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira (Santista), pela amizade, enorme confiança e credibilidade depositada ao longo destes anos de trabalho (Orientador, co-orientador...enfim sempre me apoiando para que as coisas realmente acontecessem).

Ao orientador e Prof. Dr. Edelclaiton Daros, pela amizade, apoio e acima de tudo confiança no trabalho realizado.

Ao Dr. João Carlos Bespalhok Filho, pela amizade, apoio e sugestões dadas desde o início dos trabalhos.

Ao Dr. Luiz Filipe P. Pereira, pela amizade, sugestões e apoio durante toda execução deste trabalho.

Ao Dr. Celso Jamil Marur grande incentivador durante o trabalho, pelo apoio, amizade e sugestões durante todo trabalho.

As amigas Jane e Cherrimar, quase criamos uma Empresa (CJH)!!!! Foi uma experiência muito agradável ter vocês trabalhando e me ajudando. Meu muito Obrigado!!!!

A grande e verdadeira amiga Liliane, sempre presente!!!

As grandes amigas do Lab.2, Luciana, Michele, Eliana e Débora aos bons momentos de descontração.

As amigas do Lab.1, Lúcia, Sandra e Marília pela amizade e convívio agradável.

A todos amigos do curso, especialmente Michele e Áurea pela amizade e convívio agradável.

À Sueli Kudo, pelo excelente trabalho e seriedade na condução dos trabalhos de laboratório, sempre disposta a aprender.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para realização deste trabalho de pesquisa.

Ao corpo docente da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

Ao programa de Doutorado em Agronomia (Produção Vegetal).

Ao Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR.

Ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq
pela concessão de bolsa-auxílio;

BIOGRAFIA DO AUTOR

HUGO BRUNO CORREA MOLINARI, nascido no dia 30 de junho de 1978, em Londrina – PR, filho de Hugo Molinari e Leny Maria Correa Molinari.

Engenheiro Agrônomo, formado na Universidade Estadual de Londrina – UEL em 2002, Londrina – PR.

Em Agosto de 2003, defendeu a dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular, na Universidade Estadual de Londrina, com o trabalho intitulado “Transformação genética de porta-enxertos para *Citrus* spp. visando obter maior tolerância ao estresse hídrico”.

Iniciou em março de 2004 o curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, na Universidade Federal do Paraná – UFPR, concluindo em maio de 2006, com apresentação da tese “Expressão estresse-induzida do gene *P5CS* em plantas transgênicas de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico”.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
BIOGRAFIA DO AUTOR	v
SUMÁRIO	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1 Estresses abióticos que comprometem a cultura da cana-de-açúcar	2
1.2 Resposta ao déficit hídrico	3
1.3 Estresse oxidativo	9
1.3.1 Estresse oxidativo relacionado à seca	11
1.4 Osmoprotetores	13
1.4.1 Prolina	14
1.4.2 O papel da prolina como um antioxidante	19
1.4.3 O papel da prolina como um osmoprotetor	19
1.4.4 Mecanismos de acumulação de prolina induzidos por estresse	21
1.4.5 Efeitos da prolina no metabolismo celular	22
1.5 Transformação genética em cana-de-açúcar	24
1.5.1 Transformação para tolerância a estresses abióticos	26
2 REFERÊNCIAS	31

3 ARTIGO	62
3.1 Resumo	63
3.2 Abstract	64
3.3 Introdução	65
3.4 Material e Métodos	68
3.4.1 Material Vegetal	68
3.4.2 Cultura de tecidos e transformação genética	68
3.4.3 Plasmídeo pJS107	69
3.4.4 Análises da integração do transgene	70
3.4.5 Análise da expressão do transgene	71
3.4.6 Análise da tolerância ao déficit hídrico	71
3.4.7 Medidas da fluorescência da clorofila <i>a</i>	73
3.4.8 Determinação da quantidade de prolina	73
3.4.9 Determinação do conteúdo de malondialdeído (MDA)	74
3.4.10 Determinação do conteúdo de clorofila total e testes de estresse oxidativo	74
3.4.11 Determinação da massa seca total de parte aérea e raiz	75
3.4.12 Análises estatísticas	75
3.5 Resultados	75

3.5.1	Transformação genética	75
3.5.2	Análises moleculares	78
3.5.3	Caracterização do conteúdo de água no substrato	80
3.5.4	Ensaio de tolerância ao déficit hídrico	82
3.5.5	Análise da expressão do transgene	85
3.5.6	Teores de MDA	86
3.5.7	Tratamento com herbicida paraquat.....	87
3.5.8	Análises da fluorescência da clorofila <i>a</i>	90
3.5.9	Massa seca total de parte aérea e raízes	91
3.6	Discussão	92
3.7	Conclusões	97
3.8	Referências	98

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- FIGURA 1 - Genes induzidos durante o estresse hídrico e suas possíveis funções na resposta e tolerância ao estresse (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000) 5
- FIGURA 2 - Via de transdução de sinais ao estresse hídrico desde a percepção até a expressão gênica. ABA, ácido abscísico; ABRE, ABA-responsive element; AP, apetala; bZIP, basic-region Figura 1: Via de transdução de sinais ao estresse hídrico desde a percepção até a expressão gênica. ABA, ácido abscísico; ABRE, ABA-responsive element; AP2, apétala; bZIP, basic-region leucine zipper; CRT, C-repeat; DRE, dehydration-responsive element; DREB, DRE-binding protein; erd1, early responsive to dehydration; ERF, ethylene-responsive factor; MYB e MYC, transcriptions factor; CE, coupling element, NACR, NAC recognition site, ZF-HD, zinc-finger homeodomain, *rps1*, 1-like sequence (adaptado de YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005). 7
- FIGURA 3 - Via metabólica de biossíntese de prolina em bactérias (A) e plantas superiores (B) (Via Glutamato). GSA, Ácido glutâmico γ -semialdeído; P5C, Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato; P5CS, P5C sintetase; P5CR, P5C redutase; ProDH, prolina desidrogenase; P5CDH, P5C desidrogenase 15
- FIGURA 4 - Compartimentos celulares envolvidos no metabolismo de prolina em plantas (DÍAZ et al., 1999) 16

ARTIGO

- FIGURA 1 - Diagrama do plasmídeo pJS107 utilizado nos experimentos de transformação de cana-de-açúcar. Barra em negrito corresponde à sonda usada para análises de DNA e RNA 70

FIGURA 2 - Esquema de regeneração e transformação de cana-de-açúcar. A – Explantes de folhas imaturas com 2-3 mm; B – Calos embriogênicos obtidos após 4 subcultivos em meio MS acrescido de 13 μ M de 2,4-D; C – Aparelho de bombardeamento PDS-1000/He usado nos experimentos de transformação genética da cana-de-açúcar; D – Etapa de regeneração dos calos embriogênicos em meio de cultura contendo 25 μ M de glufosinato de amônio; E – Alongamento e enraizamento das plantas putativas transgênicas de cana-de-açúcar; F – Fase de aclimatização das plantas em casa-de-vegetação; G – Fase de multiplicação dos eventos.77

FIGURA 3 - Análises de PCR de cana-de-açúcar variedade RB 855156. Linha M – Marcador de peso molecular (Ladder 100 pb); linhas 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 18 – plantas transgênicas; linhas 3, 5, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 19 – escapes; linha C – controle negativo de cana-de-açúcar variedade RB855156 (planta não transformada); P – controle positivo (plasmídeo pJS107).78

FIGURA 4 - Análise de Southern blot em cana-de-açúcar. A – Gel de agarose com amostras digeridas com as enzimas *NotI* e *BamHI*. B – Southern dos eventos selecionados. Linha ND – DNA de plantas transgênicas não digerido; Linha C – controle negativo de cana-de-açúcar variedade RB855156 (planta não transformada); Linhas 4, 6, 7 e 10 – plantas transgênicas de cana-de-açúcar variedade RB855156; P1, P3 e P5 – plasmídeo digerido correspondente a 1, 3 e 5 cópias do transgene.79

FIGURA 5 - Consumo de água relativo ao tempo inicial (Zero).81

FIGURA 6 - A - Potencial total da água; B – Potencial osmótico; C – Potencial de pressão nas folhas nos eventos transgênicos de cana-de-açúcar submetidos a 12 dias de estresse hídrico. Potenciais expressos em mega pascal (MPa). Valores são apresentados como média \pm erro padrão (n = 5) (Tukey; $p < 0,05$). Coeficientes de variação = 32,9, 27,3 e 25,2%, A, B e C respectivamente83

FIGURA 7 - Taxa de fotossíntese líquida expressa em μ mol CO₂.m⁻².s⁻¹ nos eventos transgênicos de cana-de-açúcar após 12 dias sem irrigação. Valores são apresentados como média \pm erro

padrão (n = 5) (Tukey; $p < 0,05$). Coeficiente de variação = 20,09%.....	84
FIGURA 8 - Concentração de prolina em plantas controle e transgênicas submetidas a 12 dias de estresse hídrico. Valores são apresentados como média \pm erro padrão (n = 5). Letras maiúsculas comparam colunas de mesmo padrão; letras minúsculas comparam colunas de padrões diferentes. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Coeficiente de variação = 10,7%.....	85
FIGURA 9 - Análise da expressão de <i>P5CS</i> por Northern blot em cana-de-açúcar. Linhas 1, 3, 5, 7 – plantas controle de cana-de-açúcar variedade RB855156 submetidas a 0, 6, 9 e 12 dias de déficit hídrico, respectivamente. Linhas 2, 4, 6, 8 – plantas transgênicas (evento 10) de cana-de-açúcar variedade RB855156, submetidas 0, 6, 9 e 12 dias sem irrigação.....	86
FIGURA 10 - Nível de peroxidação de lipídeos (teor de MDA) em folhas de plantas de cana-de-açúcar. Valores são apresentados como média \pm erro padrão (n = 5). Letras maiúsculas comparam colunas de mesmo padrão; letras minúsculas comparam colunas de padrões diferentes. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Coeficiente de variação = 5,09%	87
FIGURA 11 – Tolerância ao estresse oxidativo de plantas transgênicas de cana-de-açúcar produzindo prolina. Segmentos foliares incubados com 5 μ M de paraquat por 24 h. A – Segmentos foliares de plantas controle incubados com paraquat; B, D, E – eventos 4, 7 e 10, respectivamente incubados com paraquat. C e F – segmentos de planta controle e transgênica em água destilada, respectivamente	88
FIGURA 12 – Mudanças no conteúdo de clorofila total em segmentos foliares de cana-de-açúcar. A - Segmentos foliares tratados somente com água destilada; B – Segmentos foliares tratados com 5 μ M de paraquat. Segmentos foliares foram incubados 24 h sob intensidade luminosa de 50 μ mol m ⁻² s ⁻¹ . O conteúdo de clorofila é expresso em mg g ⁻¹ de massa seca. Valores são apresentados como média \pm erro padrão (n = 5). Letras maiúsculas comparam colunas de mesmo padrão; letras minúsculas comparam colunas de padrões	

diferentes. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Coeficiente de variação = 14,08 e 14,04%, A e B respectivamente89

FIGURA 13 - Rendimento quântico potencial do fotossistema II em cana-de-açúcar. A – valores de rendimento fotoquímico (F_v/F_m); B – valores de fluorescência inicial (F_0); C – valores de fluorescência variável (F_v) e D – valores de fluorescência máxima. Valores são apresentados como média \pm erro padrão ($n = 5$). Letras maiúsculas comparam colunas de mesmo padrão; letras minúsculas comparam colunas de padrões diferentes. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Coeficiente de variação = 6,5, 12,8, 15,8, 11,4%, A, B, C e D respectivamente90

FIGURA 14 - A - Massa seca de parte aérea de cana-de-açúcar; B - Massa seca da raiz de cana-de-açúcar. Valores são apresentados como média \pm erro padrão ($n = 5$). Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Coeficiente de variação = 13,6 e 14,09%, A e B respectivamente..91

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

TABELA 1 - Eficiência de transformação via biolística com a variedade de cana-de-açúcar RB855156.....	76
TABELA 2 - Conteúdo de água (θ ; $\text{m}^3 \text{m}^{-3}$) para os quatro tratamentos no período de 12 dias de déficit hídrico.....	80

RESUMO

Períodos de distribuição irregular de chuvas podem causar perdas de até 20% no setor sucroalcooleiro brasileiro. Plantas submetidas ao déficit hídrico acumulam prolina nas células a qual pode atuar como osmoprotetor e removedor de espécies reativas de oxigênio (ROS). A engenharia genética tem sido aplicada com sucesso na identificação e utilização de genes envolvidos na resposta a estresses abióticos em diferentes organismos. Altos níveis de prolina permitem que as plantas mantenham crescimento em condições de deficiência hídrica e também na presença de altas concentrações salinas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta ao estresse hídrico de plantas de cana-de-açúcar RB855156 transformadas com um gene heterólogo *P5CS*, que codifica a enzima Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase limitante na biossíntese de prolina em plantas, sob controle do promotor estresse induzido AIPC. Para isto, foram analisados 3 eventos de transformação obtidos através de bombardeamento de partículas utilizando o gene marcador de seleção *bar*. As concentrações de prolina, conteúdo de malondialdeído (MDA), clorofila total e o efeito do tratamento de estresse hídrico foram analisados. Em condições de estresse hídrico, os eventos de transformação acumularam prolina até $28,8 \mu\text{mol g}^{-1}$ de massa foliar seca em comparação com plantas não transformadas. Os níveis de MDA nas plantas controle foram em média 27% maior do que nas plantas transgênicas. Segmentos foliares de cana-de-açúcar transgênicas tratadas com $5 \mu\text{M}$ de paraquat, um herbicida indutor de estresse oxidativo celular, mostraram níveis de clorofila total em média 80% maior a partir do sexto dia de déficit hídrico comparado com as plantas não transformadas. Mesmo em condição de déficit hídrico severo, o potencial osmótico na folha tanto de plantas transgênicas quanto de plantas controle não se mostrou diferente. Até o sexto dia de estresse hídrico, tanto plantas controle quanto plantas transgênicas não apresentaram alterações significativas nos parâmetros F_0 e F_v/F_m . No nono e décimo segundo dia de estresse hídrico, plantas transgênicas apresentaram rendimento fotoquímico (F_v/F_m) em média 64% e 60% maior, respectivamente. Estes resultados sugerem a participação da prolina na proteção do aparelho fotossintético através de sua habilidade em atuar mais como um removedor de espécies reativas de oxigênio (ROS) do que como um osmoprotetor.

Palavras-chave: *Saccharum* spp., prolina, tolerância à seca, espécies reativas de oxigênio (ROS).

ABSTRACT

Periods of irregular rain distribution can cause losses of up to 20% in the Brazilian sugarcane industry. Plants submitted to water deficit accumulate proline in the cells, which can act as an osmoprotector and scavenger of reactive oxygen species (ROS). Genetic engineering has been successfully used for identification and utilization of genes involved in response to abiotic stress in several organisms. High levels of proline allow plants to maintain growing in water stress deficiency and high saline concentrations. The objective of this work was to evaluate the response of transgenic sugarcane RB855156 to water deficit stress. These plants were transformed with a *P5CS* gene, which codes for an enzyme Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, under control of a stress-inducible promoter complex AIPC. Therefore, three transformation events were obtained by biolistic technology using the *bar* gene. Free proline contents, malondialdehyde contents (MDA), total chlorophyll contents and the effect of water stress treatment were analyzed. In stressed conditions, the transformation events accumulated proline up to 28,8 $\mu\text{mol g}^{-1}$ leaf dry weight compared with non-transformed plants. The levels of MDA in control plants were 27% higher than in transgenic plants. Leaf segments of transgenic sugarcane treated with 5 μM of paraquat, an inducer of cellular oxidative stress, showed total chlorophyll contents 80% higher since the sixth day after water deficit compared with non-transformed plants. Even in severe water deficit conditions, the leaf osmotic potential of transgenic plants was not different from non-transformed plants. Under six days of water deficit, no significant alteration in F_o and F_v/F_m was found in both transgenic and control plants. On the ninth and twelfth day of water deficit, transgenic plants presented quantum yield (F_v/F_m) 64% and 60% higher, respectively. These results suggest the participation of proline in protection of photosynthetic apparatus more by its ability to act as a free radical scavenger than osmoprotection.

Key words: *Saccharum* spp., proline, drought tolerance, reactive oxygen species (ROS).

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância econômica no mundo. É cultivada em regiões tropicais e subtropicais de mais de 70 países, sendo o Brasil o maior produtor mundial de açúcar (OIA, 2006). O setor sucroalcooleiro responde por um faturamento anual da ordem de US\$ 7 bilhões (UNICA, 2006). Atualmente, as variedades de cana cultivadas são o resultado do cruzamento interespecífico entre *Saccharum officinarum*, *S. barbieri*, *S. sinense* e as espécies selvagens *S. spontaneum* e *S. robustum*. A cana-de-açúcar apresenta um dos genomas mais complexos do reino vegetal, com um número diplóide de cromossomos que varia entre 70-120 (D'HONT et al., 1996). Esta complexidade dificulta a aplicação de técnicas convencionais de melhoramento genético para a cultura visando o desenvolvimento de novos cultivares com maior produtividade e tolerância a estresses bióticos e abióticos (HOGARTH, 1987). Além disso, muitos materiais altamente promissores são descartados por apresentarem defeitos, como por exemplo, susceptibilidade a alguma doença. Desta forma, tal complexidade e fatores somados tornam a cana-de-açúcar uma excelente candidata ao melhoramento por meio da engenharia genética (ROACH, 1995).

Assim como toda cultura agrícola, a produção da cana-de-açúcar é influenciada por um grande número de fatores ambientais. Alguns desses não são passíveis de manejo, como clima, enquanto outros, como solo, podem ser manejados para permitir o melhor desempenho da cultura. A busca por altos rendimentos a baixos custos implica em conhecer mais detalhadamente a fisiologia e a genética da cultura, com o objetivo de racionalizar as relações entre os diferentes fatores de produção visando o máximo desempenho. O sucesso da indústria canavieira, indubitavelmente estará baseado em cultivares que se adaptem bem ao clima, ao solo e às características intrínsecas de uma dada região de interesse.

Atualmente, a tecnologia genômica disponível representa uma ferramenta de grande importância para o entendimento e resolução destas limitações ambientais. Tais aplicações incluem uma maior rapidez e eficiência na produção de novos cultivares que possam atender às preferências do consumidor, bem como, disponibilizá-los de maneira que possam utilizar quantidades menores de

defensivos e fertilizantes e tolerar condições ambientais adversas, podendo ocupar áreas marginais antes não ocupadas pela cultura.

Devido à grande importância da cana-de-açúcar na economia mundial, a FAPESP, pela rede ONSA (Organização para Seqüenciamento e Análise de Nucleotídeos), financiou o programa SUCEST de seqüenciamento de genes expressos da cultura.

O programa SUCEST-FAPESP gerou seqüências ESTs com alto valor científico agregado, definindo o emprego de diversos tipos de bibliotecas, originadas de estádios fisiológicos diversos, como meristemas apicais vegetativos e florais e folhas em diversas fases de desenvolvimento, vários tipos radiculares, sementes, caules, células de calos cultivados, além de tecidos infectados com bactérias simbióticas (VETTORE et al., 2001).

O seqüenciamento dos cerca de 300.000 ESTs revelou mais de 50.000 seqüências diferentes (ARRUDA, 2003). Dados gerados no programa, como análises da diferença na expressão gênica em diferentes situações fisiológicas, permitirão desvendar os mecanismos moleculares do desenvolvimento e da bioquímica da cana-de-açúcar, bem como, encontrar funções gênicas significativas responsáveis pelas características de superioridade varietal desejadas pelos melhoristas da cultura.

1.1 Estresses abióticos que comprometem a cultura da cana-de-açúcar

Plantas estão expostas a vários estresses ambientais que afetam de maneira negativa seu crescimento, metabolismo e produtividade. Seca, salinidade, baixas e altas temperaturas, inundação, poluentes e radiação são os fatores de estresse mais importantes que limitam a produtividade das culturas (LAWLOR, 2002). No Brasil, dentre estes fatores, o estresse hídrico é o que freqüentemente mais influencia de forma negativa a produtividade da cana-de-açúcar. Assim, seus efeitos nas plantas incluem redução nas taxas de assimilação de CO₂, tamanho das células foliares, taxa de transpiração, potencial de água na planta, taxa de crescimento e abertura estomática (HSIAO, 1973; TAIZ; ZEIGER, 2004). Além disso,

o déficit hídrico influencia de maneira direta o crescimento dos perfilhos e a altura final dos colmos e, conseqüentemente, a produção de açúcar (GASCHO; SHIH, 1983, SUGIHARTO, 2004).

Plantas de cana-de-açúcar necessitam de umidade disponível no solo durante todo o período de crescimento; durante a maturação, porém, o ideal é que haja redução na disponibilidade de água, não drasticamente, mas o suficiente para reduzir o crescimento e induzir a maior concentração de açúcar nos colmos (BARBIERI; VILLA NOVA, 1977, BULL, 2000).

A maioria das regiões canavieiras do país apresenta um volume adequado de chuvas para a cultura, estimado entre 1200 e 1500 mm anuais (OMETO, 1980, BULL, 2000). Entretanto, o mais importante é a distribuição pluviométrica, uma vez que esta é bastante irregular. De acordo com Doorenbos; Kassan (1979), períodos com precipitação inferior a 50 e 60 mm são considerados períodos de déficit hídrico. Em anos com distribuição irregular de chuvas, como na safra 1999/2000, ocorreram perdas de até 20% (IEA, 2000). Em 2005 em decorrência da estiagem, o Estado do Paraná apresentou quebra na safra de cana-de-açúcar de 16%, ou uma perda de cerca de 4 milhões de toneladas para o setor (ALCOPAR, 2005).

1.2 Resposta ao déficit hídrico

Embora sejam conhecidos razoavelmente bem os efeitos gerais da seca no crescimento das plantas, os efeitos primários do déficit hídrico em níveis bioquímicos e moleculares ainda não são bem entendidos (ZHU, 2002; CHAVES et al., 2003; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005). O déficit hídrico em plantas inicia-se a partir de uma complexa via de respostas, começando com a percepção do estresse, o qual desencadeia uma cascata de eventos moleculares, sendo finalizada em vários níveis de respostas fisiológicas, metabólicas e de desenvolvimento (BRAY, 1993). Uma mudança no potencial osmótico, através da membrana plasmática, pode ser a maior causa de respostas ao estresse hídrico em nível molecular (BRAY, 1993)., Também, alterações na conformação da membrana

celular provocam mudanças em canais de transporte ativados por pressão, modifica a conformação ou a justaposição de proteínas sensoriais embebidas nas membranas celulares, e altera a continuidade entre a parede e a membrana celular (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1999, 2000). A percepção do déficit hídrico celular precisa ser traduzida em compostos bioquímicos e metabólitos, gerando uma conseqüente resposta fisiológica ao estresse (INGRAM; BARTELS, 1996).

Os produtos de genes induzidos pelo estresse podem ser classificados em três grandes grupos (FIGURA 1): 1- aqueles que protegem a planta contra os estresses ambientais; 2- aqueles que regulam a expressão gênica e a transdução de sinais de resposta a estresses e 3- os de funções desconhecidas (SEKI et al., 2003; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005).

O primeiro grupo inclui proteínas que funcionam protegendo as células da desidratação, como as enzimas envolvidas na biossíntese de vários osmoprotetores tais como prolina e betaínas, proteínas LEA ("late embryogenesis abundant"), chaperonas e enzimas detoxificadoras. Os níveis de moléculas osmoprotetoras geralmente aumentam durante o estresse. Vários genes codificando enzimas envolvidas na biossíntese dessas moléculas já foram isolados, como colina desidrogenase e colina oxidase (síntese de glicina betaína), manitol-1-fosfato desidrogenase (síntese de manitol); trehalose-6-fosfato desidrogenase (síntese de trehalose); e Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase (síntese de prolina). Genes codificando enzimas que sintetizam moléculas osmoprotetoras podem ser utilizados na obtenção de plantas transgênicas com maior tolerância a estresses abióticos (HARE; CRESS, 1997, HARE et al., 1998 e 1999; SERRAJ; SINCLAIR, 2002; MOLINARI et al., 2004).

No segundo grupo, envolvido na transdução de sinais, estão os fatores de transcrição que desempenham papel fundamental na resposta da planta ao estresse (SEKI et al., 2003). Até o momento foram descritas quatro vias de transdução de sinais envolvidas na resposta da planta ao déficit hídrico (FIGURA 2): duas vias são ABA dependentes (I e II) e as outras duas ABA não dependentes (III e IV) (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997, 1999, 2000; SEKI et al., 2003; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005).

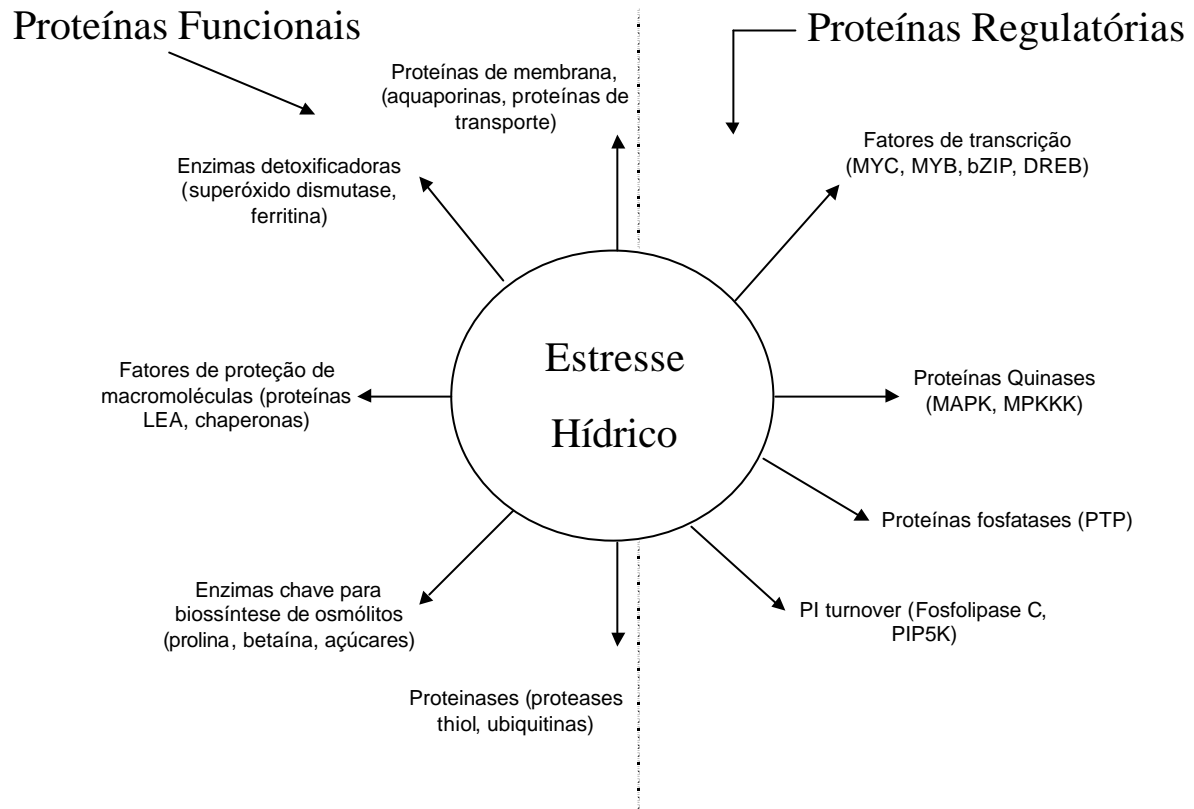


FIGURA 1: Genes induzidos durante o estresse hídrico e suas possíveis funções na resposta e tolerância ao estresse (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

A via ABA dependente tipo I requer a síntese de certas proteínas para ativar os fatores de transcrição MYC/MYB (ABE et al., 1997) e/ou bZIP, os quais se ligam a regiões do DNA como os ABREs – ABA-Responsive Elements e elementos tais como CE1 e CE3 – Coupling Elements (SHEN; HO, 1995; SHEN et al., 1996). A via ABA dependente tipo II ativa o fator de transcrição bZIP (NAKAGAWA et al., 1996; HOLLUNG et al., 1997) o qual aciona a expressão gênica pela ligação com os elementos ABA responsivos ABREs. A via ABA não dependente tipo IV induz a expressão gênica pela ativação de DREBP – Dehydration-Response-Element-Binding Protein que se liga ao elemento de resposta à seca DRE/CRT – Drought Response Element/C-repeat, conduzindo para a indução de genes estimulados pela seca e frio. A via ABA não dependente tipo III compreende alguns genes induzidos pela seca que não respondem ao ABA nem ao frio. Estes genes incluem o ERD1 – Early Responsive to Dehydration 1, que codifica para uma subunidade regulatória da protease Clp (ClpD) (NAKASHIMA et al., 1997).

Além destas vias, muitos outros sistemas de regulação transcricional estão envolvidos na expressão de genes responsivos ao estresse. De maneira paralela, estas quatro principais vias se relacionam e convergem para a ativação de genes envolvidos na resposta ao estresse. A FIGURA 2 mostra a via completa de transdução de sinais ao estresse hídrico desde a percepção até a expressão gênica.

Muitos genes são induzidos pela seca, salinidade e baixa temperatura. Isto sugere que existe uma comunicação cruzada (“cross-talk”) entre estas vias de sinalização, implicando na interação de diferentes elementos em *cis* envolvidos na expressão de genes. Além disso, existe uma complexa e específica rede de genes para o “cross-talk” na resposta a estresses abióticos (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005).

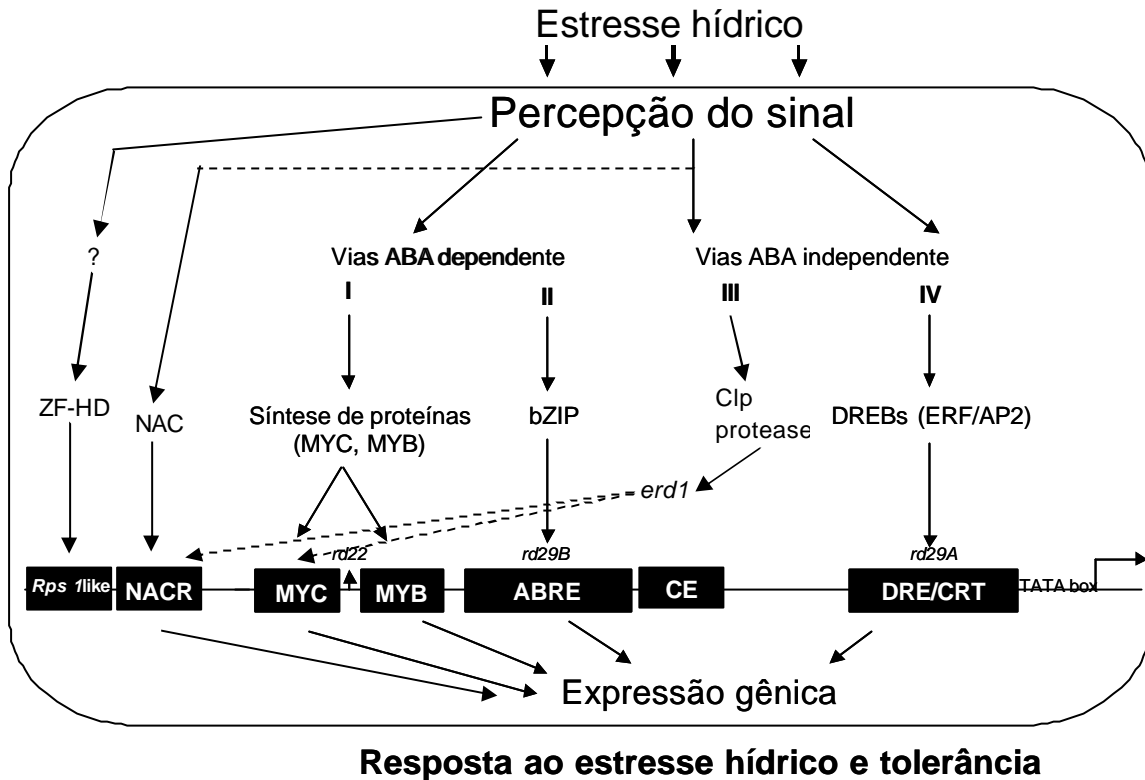


FIGURA 2: Via de transdução de sinais ao estresse hídrico desde a percepção até a expressão gênica. ABA, ácido abscísico; ABRE, ABA-responsive element; AP2, apétala; bZIP, basic-region leucine zipper; CRT, C-repeat; DRE, dehydration-responsive element; DREB, DRE-binding protein; erf1, early responsive to dehydration; ERF, ethylene-responsive factor; MYB e MYC, transcriptions factor; CE, coupling element, NACR, NAC recognition site, ZF-HD, zinc-finger homeodomain, *rps1*, 1-like sequence (adaptado de YAMAGUCHI-SHINOZAKI, SHINOZAKI, 2005).

Como descrito anteriormente, o ABA desempenha um papel importante na adaptação de plantas a estresses abióticos tais como seca, salinidade, bem como na germinação e dormência de sementes. O ABA regula a expressão de muitos genes que podem atuar na tolerância a desidratação de plantas. A região promotora de vários genes ABA induzíveis foram comparadas e uma sequência conservada PyACGTGGC, foi encontrada em suas regiões promotoras. Esta sequência foi primeiramente identificada como um elemento em *cis*, denominado ABRE, no gene *Em* de trigo, que se expressa principalmente em sementes durante a fase tardia de embriogênese (GUILTINAN et al., 1990) e no gene *RAB16* de arroz, expresso em tecidos desidratados e em sementes em fase de

maturação (MUNDY et al., 1990). O elemento ABRE é o principal elemento em *cis* na expressão gênica ABA-responsiva.

Vários outros genes induzíveis possuem além do ABRE um elemento em *cis* similar chamado de G-box (CACGTGGC) (MENKES et al., 1995). Todos estes promotores requerem pelo menos um elemento em *cis* em complementação a um G-box para ativação transcricional adequada. Uma única cópia do ABRE não é suficiente para transcrição de genes ABA induzíveis. O ABRE em complementação a elementos como CE1 e CE3 constituem um complexo ABA responsivo eficiente na regulação dos genes *HVA1* e *HVA22* de trigo (SHEN; HO, 1995; SHEN et al., 1996).

Estudos com o promotor ABA-responsivo *HVA22* de cevada que possui uma seqüência ABRC1 (ABA responsive complex) de aproximadamente 49 bp, ligados a um promotor truncado da α -amilase da cevada (*AMY 64*) e acoplados a uma região intron de aproximadamente 233 pb do gene *HVA22* (*HVA22I*) induziram cerca de 30 vezes a expressão do gene *uidA* (GUS) em experimentos com células em suspensão de cevada (SHEN et al., 1995). O uso de mais de uma cópia da região ABRC1 gerou dois tipos de promotores (SU et al., 1998). Estes promotores foram testados em arroz e aumentaram a expressão do gene GUS de 3 a 8 vezes com a aplicação de ABA e submissão a déficit hídrico e salinidade. Plantas com 4 cópias do complexo ABA-responsivo mostraram níveis de expressão do gene GUS 50 a 200% maior.

Zhu et al., 1998 usaram o complexo ABA-responsivo ligado ao promotor mínimo do gene da Actina (*act-100*) e ao íntron do gene *HVA22*, denominado de complexo promotor estresse induzido (AIPC), para controlar a expressão do gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia*. Esta construção foi testada em arroz e seu promotor usado para conduzir a expressão em muitos tecidos, como folhas, raízes, tornando-se uma excelente ferramenta para o estudo de genes relacionados com a tolerância aos estresses abióticos em monocotiledôneas (SU et al., 1998; SU; WU, 2004).

1.3 Estresse oxidativo

A formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) tem sido relatada por vários autores como produto do estresse biótico e abiótico (FOYER; NOCTOR, 2000; REDDY et al., 2004).

O oxigênio atômico é o elemento mais abundante na superfície da terra; o oxigênio molecular na atmosfera e na água é requerido para suportar todas as formas de vida aeróbicas (GILBERT, 1981). A reserva presente de oxigênio na terra foi sendo construída como resultado da fotossíntese, um processo que libera oxigênio a partir da água (PRICE et al., 1989). Ele é mantido praticamente constante pela respiração, no qual o oxigênio (O_2) é usado comoceptor final de elétrons (ELSTNER, 1987). Também, os átomos de oxigênio são “fixados” em várias moléculas orgânicas através de uma variedade de enzimas (por exemplo, oxigenases) e processos não enzimáticos (GILBERT, 1981). Organismos aeróbicos devem, entretanto, adequar-se aos efeitos adversos do O_2 . Em altas concentrações na atmosfera, o O_2 pode inibir ou inativar certas enzimas e também competir com a fixação fotossintética do CO_2 pela ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase, aumentando o custo energético da fotossíntese (MORAN et al., 1994). Ainda, o efeito tóxico do oxigênio é principalmente atribuído aos seus derivados reativos (MITTLER, 2002). Para o oxigênio se tornar quimicamente reativo, ele deve ser ativado fisicamente ou quimicamente:

A ativação física ocorre principalmente pela transferência da energia de excitação de um pigmento foto-ativado, tal como uma molécula de clorofila excitada. Esta energia é altamente difusível e capaz de reagir com moléculas orgânicas, causando danos nas membranas do aparelho fotossintético (NOCTOR; FOYER, 1998).

A ativação química ocorre por meio de um processo onde são formados os íons superóxidos (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxil (OH), os quais são altamente reativos e biologicamente tóxicos (MCKERSIE; LESHEM, 1994). Suas toxicidades estão relacionadas as suas meia-vidas antes de reagir com componentes celulares (BOWLER et al., 1992). As espécies reativas de oxigênio (ROS) colidem com as moléculas orgânicas, extraindo um elétron desta.

Desta forma, faz com que este radical se propague numa reação em cadeia, por exemplo, gerando radicais peroxil (ROO) e alkoxil (RO) (MCKERSIE et al., 2000).

O superóxido é o primeiro produto da redução do oxigênio molecular, sendo capaz tanto de se reduzir como oxidar. Ele pode reagir para produzir várias outras espécies reativas e pode formar H_2O_2 tanto enzimática ou espontaneamente (PITCHER; ZILINSKAS, 1996).

O peróxido de hidrogênio não é um radical livre, mas participa como oxidante e redutor em muitas reações celulares (PRICE et al., 1989). Contrário ao superóxido, o peróxido de hidrogênio é altamente difusível através das membranas e compartimentos aquosos e pode inativar diretamente enzimas sensíveis em baixas concentrações. Tal como o superóxido, o H_2O_2 é pouco estável e, portanto menos tóxico que outras espécies reativas de oxigênio; a principal ameaça imposta pelo superóxido e peróxido de hidrogênio está na habilidade de ambos gerarem altas quantidades de radicais hidroxil (SGHERRI; NAVARI-IZZO, 1995).

O radical hidroxil é a mais potente espécie oxidante encontrada em sistemas biológicos. Ele reage de forma não específica com qualquer molécula biológica. Até o momento, nenhum removedor específico de radicais hidroxil é conhecido, embora alguns metabólitos, tais como a uréia ou glicose, foram propostos como sendo removedores destes em sistemas animais (BARTELS, 2001).

As diferentes formas de espécies reativas descritas acima causam uma variedade de danos nas células vegetais como: 1. inibição de enzimas sensíveis; 2. degradação da clorofila ou “bleaching”; 3. peroxidação lipídica; radicais livres, H_2O_2 e oxigênio singlete atacam prontamente ácidos graxos insaturados, produzindo hidroperóxidos de lipídeos, em presença de metal catalisador, e radicais alkoxil e peroxil que desencadeiam uma série de reações nas membranas, mudando e desfazendo estruturas lipídicas e alterando a integridade e organização das membranas (YU, 1994); adicionalmente, alguns aldeídos e hidrocarbonetos produzidos pela peroxidação lipídica exercem efeitos citotóxicos em sistemas animais (ESTERBAUER et al., 1990). 4. ataque de radicais hidroxil à moléculas orgânicas, incluindo o DNA.

Uma variedade de espécies alteradas oxidativamente podem ser identificadas seguidas do ataque de hidroxil, incluindo alterações nas bases

nitrogenadas e quebras que podem dificultar seu reparo ou tolerância (KASAI et al., 1986). Proteínas expostas a este radical passam por modificações típicas, incluindo alterações na especificidade dos aminoácidos, fragmentação polipeptídica, agregação, desnaturação e susceptibilidade à proteólise (WOLFF et al., 1986; REDDY et al., 2004).

1.3.1 Estresse oxidativo relacionado à seca

As plantas estão expostas, durante o crescimento e desenvolvimento, a grandes mudanças climáticas no ambiente em que vivem, tendo que apresentar um amplo espectro de respostas no seu desenvolvimento, bem como adaptações bioquímicas para a condição estressante. A grande quantidade de informação gerada nesta área mostra uma intrincada via de transdução de sinais em plantas e os múltiplos papéis que os radicais de oxigênio desempenham no metabolismo da planta (SMIRNOFF, 1998).

Ao longo destes anos, vários estudos fisiológicos encontraram correlação entre níveis de antioxidantes e o nível de tolerância ao estresse em espécies, variedades e biótipos de plantas. Em muitos casos, o dano induzido pelos ROS está relacionado com situações de estresse causadas por calor, frio, raios ultravioleta (UV), poluentes no ar e seca. Outro importante aspecto dos ROS é seu envolvimento na sinalização molecular, o que implica que a característica de tolerância poderia ser selecionada ou geneticamente modificada contra um tipo de estresse, resultando em uma co-tolerância a outros tipos (GRESSEL; GALUN, 1994).

Durante o déficit hídrico, as plantas apresentam alteração no transporte de elétrons mediado pelos radicais superóxido formados (O_2^-) que competem com o NADP para redução no fotossistema I (REDDY et al., 2004). Como consequência, pode ocorrer a perda e redução das proteínas D1 e D2 do fotossistema II (REDDY et al., 2004). A diminuição da assimilação de CO_2 , redução das atividades dos fotossistemas e alteração no sistema de transporte de elétrons, aceleram a geração de ROS, via cloroplasto (ASADA, 1999).

Os ROS têm a capacidade de inativar enzimas e danificar estruturas e componentes celulares importantes (ASADA,1999). As enzimas do ciclo de Calvin-Benson, enzimas que contêm Fe^{+2} , e as proteínas D1 e D2, são as mais afetadas pelos ROS (REDDY et al., 2004).

Várias enzimas parecem estar envolvidas no mecanismo de proteção aos ROS, como as catalases, superóxido dismutase, peroxidases, glutatona. Além destas, outras moléculas podem participar do sistema antioxidante das plantas como os flavonóides, alcalóides, ácido ascórbico e carotenóides (REDDY et al., 2004).

Em tomate, a enzima Cu/Zn-SOD (superóxido dismutase) citosólica apresentou forte indução pelo déficit hídrico, enquanto a Cu/Zn-SOD cloroplástica não se alterou. Enzimas como a glutatona redutase mostraram-se altamente induzidas em condições de déficit hídrico (EDREVA, 2005). REDDY et al., 2004 sugerem que as enzimas removedoras de ROS, além de remover o H_2O_2 ajudam o fotossistema I, tornando o NADP disponível para aceitar os elétrons provenientes da ferredoxina, minimizando assim a formação dos íons superóxido.

Sairam et al., (1998) desmostraram que os sistemas de remoção de ROS pelas enzimas ascorbato peroxidase, glutatona redutase e catalase são importantes para a diminuição da peroxidação lipídica, mantendo a estabilidade de membranas, bem como os conteúdos de clorofilas e carotenóides presentes.

Além das enzimas antioxidativas, as plantas podem tolerar o estresse oxidativo pela síntese e acúmulo de osmólitos compatíveis ou osmoprotetores. Dentre estes, aminoácidos como a prolina parecem estar envolvidos na tolerância (LAWLOR; CORNIC, 2002). A prolina por possuir um anel pirrolina, que confere uma baixa capacidade de ceder elétrons, forma um complexo de transferência de carga e sequestra O^2 livre (REDDY et al., 2004). Assim, a prolina pode reduzir o dano por fotoinibição nas membranas do tilacóide pelo seqüestro e redução da produção de íons superóxido (REDDY et al., 2004).

1.4 Osmoprotetores

A classe de pequenas moléculas conhecidas como osmólitos compatíveis inclui aminoácidos como a prolina, compostos quaternários de amônio (glicina betaína, prolina betaína, B-alanina betaína, e colina-*O*-sulfato) e o composto terciário de sulfato, 3-dimetilsulfoniopropionato (DMSP). Os compostos quaternários de amônio e DMSP são derivados de precursores de aminoácidos (YANCEY, 1994; SAKAMOTO; MURATA, 2000).

Estes compostos compartilham a propriedade de permanecerem invariáveis em pH neutro e serem altamente solúveis em água (BALLANTYNE; CHAMBERLIN, 1994). Além disso, em altas concentrações, têm pequeno ou nenhum efeito sobre a interação de macromoléculas solventes (YANCEY et al, 1982; LOW, 1985; SOMERO, 1986; TIMASHEFF, 1993; YANCEY, 1994), diferentemente, dos íons inorgânicos que entram prontamente na esfera de hidratação de proteínas, favorecendo seu desdobramento. Os osmólitos compatíveis tendem a serem excluídos da esfera de hidratação das proteínas e estabilizam a estrutura de proteínas (LOW, 1985). Estes compostos têm um papel fundamental no ajustamento osmótico do citoplasma da planta durante a resposta ao estresse osmótico (WYN JONES et al., 1977).

O acúmulo de osmólitos em células de plantas resulta em um decréscimo no potencial osmótico e também na manutenção da absorção de água e pressão de turgor da célula, o que contribui para a manutenção dos processos fisiológicos, como abertura estomática, fotossíntese e crescimento da planta (BLUM, MAYER; GOZLAN, 1983; MORGAN, 1984; LUDLOW; MUCHOW 1990; BLUM, 1996). O acúmulo de osmólitos em plantas tem sido utilizado com ênfase em critérios de seleção nos programas tradicionais de melhoramento de plantas para aumento da produtividade em ambiente com deficiência hídrica (BLUM et al., 1983; LUDLOW; MUCHOW 1990; TANGPRENSRI et al., 1991; BELHASSEM et al., 1995; ZHANG, NGUYEN; BLUM, 1999; CLAUSSEN, 2005).

1.4.1 Prolina

L-prolina é um dos 20 aminoácidos presentes nas proteínas de todos os organismos vivos. Aminoácidos são moléculas que contêm ambas porções amino ($-\text{NH}_2$) e um grupo funcional carboxil ($-\text{COOH}$). Diferentemente, prolina contém uma porção imino ($\text{C}=\text{NH}$), um grupo funcional carboxil e um grupo imine secundário, tendo sido reportada como um importante osmoprotetor em muitas plantas.

Este aminoácido, na sua forma pura, apresenta-se como uma substância incolor, altamente solúvel em água, medianamente solúvel em álcoois, razoavelmente em benzeno e acetona e insolúvel em outros compostos (MILNER-WHITE et al., 1992).

Em plantas, o aminoácido prolina é sintetizado a partir de glutamato via Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C) por duas sucessivas reduções, as quais são catalisadas pelas enzimas P5C sintetase (*P5CS*) e P5C redutase (*P5CR*) (HARE et al., 1999) (FIGURA 3) ou alternativamente a partir de ornitina pela enzima ornitina δ -aminotransferase – OAT (ROOSENS et al., 1998; LUTTS et al., 1999).

A enzima Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato redutase (*P5CR*) foi a primeira a ser identificada e caracterizada em muitas espécies de plantas (KREUGER et al., 1986; TREICHEL, 1986; LAROSA et al., 1991). A localização no cloroplasto desta enzima foi reportada em ervilha (RAYAPATI et al., 1989). Por outro lado, Szoke et al. (1992) encontrou atividade da enzima *P5CR* na fração citosólica de raízes e nódulos de soja, bem como em células de folha. As diferentes localizações da enzima *P5CR* indicam que a prolina pode ser sintetizada em diferentes compartimentos celulares, como no citosol e estroma de cloroplastos, via Fd-GOGAT (glutamato sintase ferredoxina dependente) (FIGURA 4).

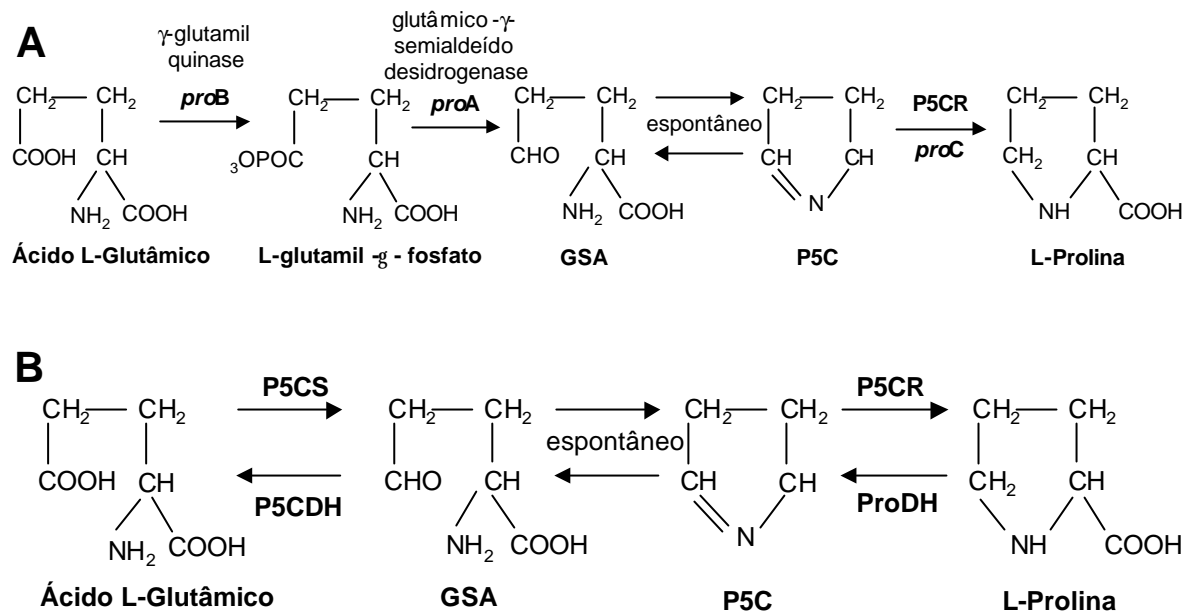


FIGURA 3: Via metabólica de biossíntese de prolina em bactérias (A) e plantas superiores (B) (Via Glutamato). GSA, Ácido glutâmico γ -semialdeído; P5C, Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato; P5CS, P5C sintetase; P5CR, P5C redutase; ProDH, prolina desidrogenase; P5CDH, P5C desidrogenase.

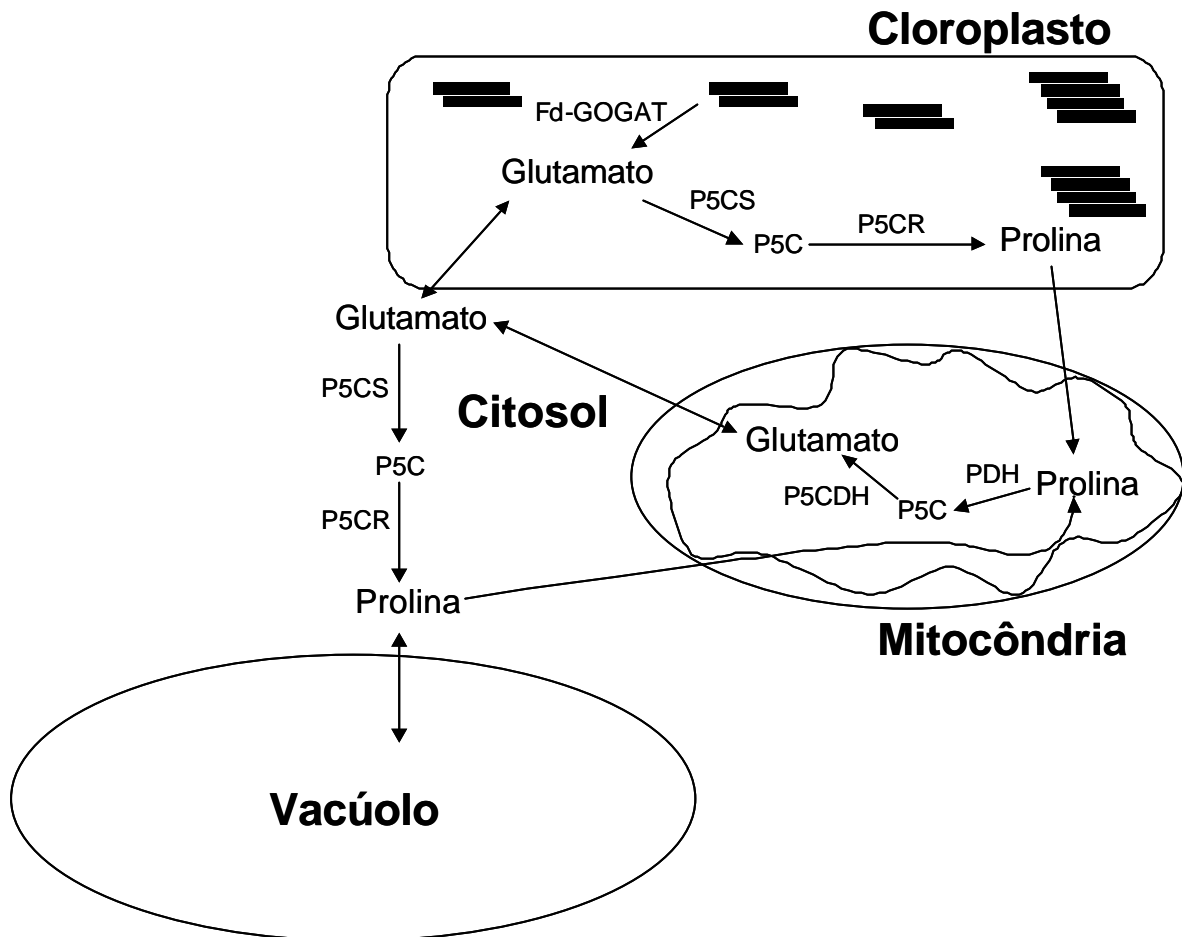


FIGURA 4. Compartimentos celulares envolvidos no metabolismo de prolina em plantas (DÍAZ et al., 1999).

O gene codificando a enzima *P5CR* foi identificado por teste de complementação direta de uma linhagem de *E. coli proC* auxotrófica com clones de uma biblioteca de cDNA de nódulos de soja (DELAUNEY; VERMA, 1990), facilitando o isolamento de *P5CR* homólogos de *Pisum sativum* (WILLIAMSON; SLOCUM, 1992) e *Arabidopsis thaliana* (VERBRUGGEN et al., 1993).

Transcritos de *P5CR* aumentam abundantemente em resposta ao estresse osmótico, indicando que o gene *P5CR* transcrito é controlado sob estresse osmótico (DELAUNEY; VERMA, 1990; WILLIAMSON; SLOCUM, 1992; VERBRUGGEN et al., 1993). O promotor do gene *P5CR* proporciona forte expressão de GUS em ápices radiculares, meristema, células guarda, grãos de pólen, óvulos e sementes em desenvolvimento (HUA et al., 1997).

O cDNA de *P5CR* de soja, quando superexpresso em tabaco, não resultou em um aumento significativo nos níveis de prolina em plantas transgênicas, apesar de um aumento de 100 vezes na atividade da enzima comparado ao controle (SZOKE et al., 1992). Assim, *P5CR* mostrou não ser o passo limitante no acúmulo de prolina em plantas superiores (LAROSA et al., 1991; DELAUNEY; VERMA, 1993).

Em bactérias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*, a síntese de prolina a partir de glutamato é catalisada por três enzimas: a gama glutamil quinase (GK), a glutamil fosfato redutase (GPR), glutamato 5-semialdeído desidrogenase e a P5C redutase (*P5CR*), codificadas pelos genes *proB*, *proA* e *proC*, respectivamente (DEUTCH et al, 1984; SMITH et al, 1984).

A partir de uma biblioteca de cDNA de *Vigna aconitifolia*, foi encontrado e caracterizado o gene da enzima bifuncional, Δ^1 -pirrolina-5-caboxilato sintetase (*P5CS*), que apresenta ambas atividades GK e GPR (HU et al., 1992). Empregando-se mutantes auxotróficos de *E. coli* para prolina *proA*, *proB* e *proBA* foi possível demonstrar o crescimento da bactéria na ausência de prolina. A única e maior ORF (Open-Reading Frame) deste cDNA codifica um polipeptídeo de 73,2 kDa, o qual possui dois domínios distintos, exibindo 55,3% de similaridade global para GK de *E. coli* e 57,9% de similaridade para GPR de *E. coli* (HU et al., 1992).

A atividade GK da enzima bifuncional *P5CS* de *Vigna aconitifolia* é inibida por prolina (50% de inibição com 5 mM de prolina). Esta enzima parece ser muito menos sensível por inibição por retroalimentação que o genótipo selvagem GK de *E. coli* (HU et al., 1992). Análises de Northern blot indicaram que o gene *P5CS* é induzido (particularmente em folhas) pelo tratamento de plantas de *Vigna* com 200 mM de NaCl (HU et al., 1992). Dessecação, estresse salino e ABA induzem fortemente transcritos RNAm do gene *P5CS* em *Arabidopsis* (YOSHIBA et al., 1995). Savoure et al. (1997) sugerem que a expressão de genes para a biossíntese de prolina são dependentes em pelo menos duas vias de transdução de sinais; uma ativada por aplicação exógena de ABA na ausência de estresse e outra ativada por frio e estresse osmótico independentemente da aplicação exógena de ABA.

A enzima *P5CS* é limitante para a síntese de prolina, sendo sensível à inibição por retroalimentação. Plantas transgênicas de tabaco superexpressando o gene *P5CS* parecem ter aumentado a sua tolerância ao estresse hídrico e salino (KISHOR et al., 1995). Entretanto, os dados disponíveis foram insuficientes para se concluir com certeza que o acúmulo de prolina nestas plantas transgênicas contribui para o aumento da tolerância via ajustamento osmótico ou por algum outro mecanismo (SHARP et al., 1996). Como discutido por Hare; Cress (1997), os dados obtidos pelos autores são contraditórios para relação hídrica destas plantas transgênicas, sendo necessária uma maior investigação dos fenótipos observados.

O gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia* foi introduzido em arroz sob o controle de um promotor ABA-induzido. As plantas transgênicas de arroz acumularam 2,5 vezes mais prolina que as plantas controle sob condição de estresse. Resultados preliminares mostraram que a expressão induzida do gene *P5CS* na segunda geração de plantas transgênicas de arroz proporcionou um aumento da biomassa, refletindo no aumento do peso fresco de raiz e parte aérea sob condições de estresse hídrico e salino (ZHU et al, 1998).

1.4.2 O papel da prolina como um antioxidante

O estresse hídrico desencadeia muitos processos bioquímicos e fisiológicos importantes como, por exemplo, ajustamento osmótico e afeta o sistema de defesa de enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica. Este causa o acúmulo de ROS, tais como radicais superóxido, H_2O_2 e OH (PASTORI; FOYER, 2002). Em baixas concentrações, estes radicais servem como moléculas sinais na resposta adaptativa das plantas frente ao estresse, porém, em excesso podem causar danos oxidativos nas células.

Os radicais hidroxil são gerados pelo ascorbato/ H_2O_2 ou pela xantina oxidase/hipoxantina/ H_2O_2 e detectados pela hidroxilação do salicilato ou pela desnaturação da enzima malato desidrogenase. O aminoácido prolina tem sido reportado como um removedor de diferentes ROS em certos sistemas de detecção e geração *in vitro*. Smirnoff; Cumbes (1989) demonstraram a propriedade da prolina na remoção de radicais hidroxil (OH). O OH pode reagir com a prolina causando uma alteração dos prótons pela formação de um radical mais estável (FLOYD; NAGY, 1984). O radical prolina-nitroxil R_2N-O é também formado da reação entre OH e prolina (FLOYD; NAGI, 1984). Similarmente, Alia et al. (2001) reportaram a ação de “quenching” da prolina nos oxigênios “singlet” (1O_2). O “quenching” de oxigênio singleto pela prolina parece estar baseado na sua capacidade de formar um complexo de transferência que funciona devido a um baixo potencial de ionização. Os mecanismos de “quenching” de ROS pela prolina foram revisados por Matysik et al. (2002).

1.4.3 O papel da prolina como um osmoprotetor

O acúmulo de prolina representa uma resposta metabólica comum de plantas superiores ao déficit hídrico e estresse salino, e tem sido tema de numerosas revisões nos últimos 25 anos (DELAUNEY; VERMA, 1993; SAMARAS et al., 1995; TAYLOR, 1996; HARE; CRESS, 1997; HARE et al., 1998 e 1999; SERRAJ; SINCLAIR, 2002; KISHOR et al., 2005).

Este aminoácido é acumulado em folhas de muitas espécies de plantas halofíticas superiores que crescem em ambientes salinos (BRIENS; LARHER, 1982; TREICHEL, 1986), em tecidos de folha e meristemas apicais de plantas submetidas a estresse hídrico (BOGGESS et al., 1976; JONES et al., 1980), em pólen dessecado (HONG-QI et al., 1982; LANSAC et al., 1996), em regiões apicais de raízes crescendo em baixos potenciais de água (VOETBERG; SHARP, 1991) e em células em suspensão submetidas ao estresse hídrico (TAL; KATZ, 1980; HANDA et al., 1986; RHODES et al., 1986) ou estresse salino (BINZEL et al., 1987; RHODES; HANDA, 1989; THOMAS et al., 1992).

De acordo com Alia (2003) a prolina em plantas constitui menos que 5% dos aminoácidos totais livres em condições normais, mas sob várias formas de estresse a concentração de prolina pode chegar a 80% do “pool” total de aminoácidos. Plantas naturalmente adaptadas a ambientes salinos produzem altos níveis de prolina (aproximadamente $100 \mu\text{mol g}^{-1}$ de matéria fresca) como é o caso das halófitas. Estes níveis podem aumentar até 10X (até $1500 \mu\text{mol g}^{-1}$ de matéria fresca) em resposta a altas concentrações salinas (THOMAS; BOHNERT, 1993).

A prolina protege a membrana celular e proteínas contra efeitos adversos de altas concentrações de íons inorgânicos e temperaturas extremas (RUDOLPH et al., 1986; SANTARIUS et al., 1992; SANTORO et al., 1992). A prolina pode também funcionar como um osmólito compatível inibitório da agregação de proteínas (SRINIVAS; BALASUBRAMANIAN, 1995).

O acúmulo de prolina em resposta ao estresse salino ou hídrico em plantas é primariamente localizado no citosol (KETCHUM et al., 1991; PAHLICH et al., 1993).

Em meristemas apicais de raízes de milho, a prolina representa o soluto em maior quantidade, alcançando concentrações de 120 mM em raízes crescendo em um potencial de água de -1.6 MPa e representa uma significativa fração (~50%) do ajustamento osmótico desta região (VOETBERG; SHARP, 1991). O acúmulo de prolina em meristemas apicais de raízes de milho em resposta ao estresse hídrico envolve aumento do seu depósito em regiões de crescimento e parece requerer ABA (OBER; SHARP, 1994; SHARP et al., 1994).

O suplemento exógeno de prolina funciona como um osmoprotetor para bactérias, facilitando seu crescimento em ambientes altamente salinos (CSONKA; HANSON, 1991; YANCEY et al., 1994). Um aumento na osmoproteção de bactérias causado pela superprodução de prolina deve-se a uma alteração na inibição por retroalimentação na via biossintética de prolina (CSONKA, 1981; SMITH, 1985). O acúmulo de prolina no citoplasma é acompanhado por uma redução nas concentrações de solutos pouco compatíveis e um aumento no volume de água no citosol (CAYLEY et al., 1991). Em células de plantas superiores, o suplemento exógeno de prolina pode ser osmoprotetor (HANDA et al., 1986; LONE et al., 1987) e crioprotetor (SONGSTAD et al., 1990; SANTARIUS et al., 1992).

Em uma seleção de mutantes resistentes a hidroxiprolina em cevada e trigo foram identificadas linhagens que acumulavam grandes quantidades de prolina em comparação ao genótipo selvagem (KUEH; BRIGHT, 1981; DORFFLING et al., 1993). Entretanto, parece que as concentrações de prolina acumuladas por estes mutantes podem ser uma ordem de magnitude menor que as requeridas para produzir efeitos fisiológicos significativos sob estresse osmótico (LONE et al., 1987).

A síntese de prolina pode estar envolvida na recuperação da acidose citoplasmática, podendo manter a relação $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ em valores compatíveis com o metabolismo normal (HARE; CRESS, 1997). O catabolismo rápido de prolina pode promover reduções equivalentes que suportem a fosforilação oxidativa mitocondrial e a geração de ATP para a recuperação e conseqüente reparo de danos causado pelo estresse (HARE; CRESS, 1997).

1.4.4 Mecanismos de acumulação de prolina induzidos por estresse

O estresse osmótico resulta de um aumento na taxa biossintética de prolina (RHODES et al., 1986; RHODES; HANDA, 1989). O acúmulo de prolina envolve a indução (PENG et al., 1996) e/ou ativação de enzimas da biossíntese de prolina, provavelmente junto com o controle da inibição por retroalimentação da via de produção de prolina (STEWART, 1981; DELAUNEY; VERMA, 1993), o decréscimo de oxidação de prolina para glutamato (SELLS; KOEPPE, 1981;

ELTHON; STEWART, 1982) mediado por uma baixa regulação de prolina desidrogenase (KIYOSUE et al., 1996; PENG et al., 1996), o decréscimo na utilização de prolina na síntese de proteínas (BOGGESE; STEWART, 1980; STEWART, 1981) e o aumento no “*turn over*” protéico (FUKUTOKU; YAMADA, 1984).

O estresse hídrico induz grandes aumentos na concentração de prolina no floema de alfafa (GIROUSSE et al., 1996), sugerindo que o aumento na deposição de prolina no ápice radicular em plantas estressadas hidricamente pode, em parte, ocorrer pelo transporte de prolina via floema (GIROUSSE et al., 1996). Um gene de transporte de prolina, *ProT2*, se mostrou fortemente induzido por déficit hídrico e estresse salino em *Arabidopsis thaliana* (RENTSCH et al., 1996). Também, um gene homólogo transportador de prolina foi encontrado em tomate, *LeProT1* (SCHWACKE et al., 1999). Este gene é fortemente expresso em pólen maduro e em fase de germinação e está envolvido no transporte de outros solutos compatíveis, como glicina betaína e GABA (Ácido γ -Amino-Butírico).

Altos níveis de prolina livre tem sido reportados pela modificação genética de várias espécies de plantas. As modificações visadas foram tanto para suprimir quanto para superexpressar as enzimas chave no metabolismo de prolina e as plantas geneticamente modificadas resultantes tem exibido aumento de tolerância a vários tipos de estresses abióticos (KISHOR et al., 1995; ZHU et al., 1998; NANJO et al., 1999; HONG et al., 2000; ROOSENS et al., 2002; MOLINARI et al., 2004; DE RONDE et al., 2004; HMIDA-SAYARI et al., 2005). Adicionalmente, o aumento dos níveis de outros osmólitos tais como: modificações genéticas para aumento da tolerância a estresses abióticos, podem ser encontradas em revisão recente (BLUMWALD et al., 2004).

1.4.5 Efeitos da prolina no metabolismo celular

Plantas transgênicas transformadas com o objetivo de superproduzir o osmólito prolina poderiam ter seu crescimento reduzido na ausência de estresse, devido ao acúmulo de prolina. Para testar esta possibilidade, níveis intracelulares de

prolina foram manipulados pela expressão do gene *tomPRO2* mutante (Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase, *P5CS*, de tomate) em *Saccharomyces cerevisiae*. Este experimento foi conduzido na presença e na ausência da enzima prolina oxidase (PDH), seguido da seleção de leveduras com aumento da concentração de prolina na ausência de estresse. Foi observado que o nível de acúmulo deste aminoácido mostrou-se inversamente correlacionado em células que cresciam em condições normais osmóticas (MAGGIO et al., 2002). Também, a concentração intracelular de prolina resultou em um aumento no número de ploidia, na vacuolação e no acúmulo alterado de vários e diferentes transcritos relacionados à divisão celular e ao controle da expressão gênica (MAGGIO et al., 2002).

Em *A. thaliana*, a expressão antisense do gene *P5CS* inibiu a produção de prolina fazendo com que as plantas se tornassem hipersensíveis ao estresse osmótico (NANJO et al., 1999). Foi ainda provado que estas plantas transgênicas antisense tiveram um impacto negativo no desenvolvimento da inflorescência e mostraram alterações na morfologia da diferenciação vascular devido a uma mudança nas proteínas estruturais da parede celular (NANJO et al., 1999).

Danos na ultraestrutura de cloroplastos e mitocôndrias foram observados em plântulas de *A. thaliana* tratadas com concentrações milimolares de prolina exógena. Essa descoberta aponta para possíveis danos que este aminoácido pode causar quando as plantas superproduzem prolina (HARE et al., 2002). Assim, se faz necessário maiores estudos em plantas onde naturalmente os “pools” metabólicos de formação de prolina são menores.

Realizaram-se também estudos *in vitro* para verificar o papel osmoprotetor da prolina sobre a atividade da enzima Rubisco (Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase) (SIVAKUMAR et al., 1998). Concentrações crescentes desse aminoácido foram testadas com a principal enzima do cloroplasto (Rubisco), purificada de plântulas de *Brassica juncea*, *Sesbania sesban* e *Oryza sativa*. A prolina, na concentração de 1 M, mostrou uma redução de aproximadamente 50% na atividade da Rubisco nestas espécies. Estes dados são contrários aos publicados na literatura, onde a prolina tem mostrado desempenhar

um papel vital na manutenção da integridade e na estabilização de macromoléculas (SCHWAB; GAFF, 1990; GERAND et al., 1991).

Outro efeito negativo diz respeito ao acúmulo de sacarose pelas plantas de cana-de-açúcar transgênicas resultante da competição entre a síntese de sacarose e aminoácidos. Quando ocorre a assimilação de uma fonte de nitrogênio (amônia) pela planta, esta exige uma alta demanda por esqueletos de carbono (CHAMPIGNY, 1995) que poderia ocasionar em um desvio de esqueletos de carbono para produção deste aminoácido.

Entretanto, estudos indicam que a prolina desempenha um importante papel durante o desenvolvimento das plantas servindo como uma fonte rápida e acessível de energia (PHANG, 1985). Além disso, segundo Hu et al. (1996) a oxidação de uma molécula de prolina fornece 30 ATPs para a célula. Neste contexto, é importante saber como o acúmulo de prolina influencia outras vias de energia relacionadas, bem como no metabolismo de carbono durante e após o período de submissão a estresses abióticos.

1.5 Transformação genética em cana-de-açúcar

O melhoramento direcionado para obter tolerância ao estresse hídrico em plantas de cana-de-açúcar tem mostrado consideráveis graus de sucesso no desenvolvimento de variedades de melhor performance a campo sob condições de estresse hídrico. Entretanto, o melhoramento clássico de cana-de-açúcar demanda tempo e muito trabalho, além de oferecer um estoque genético limitado relacionado à tolerância à seca nos bancos de germoplasma.

Uma alternativa para se criar novas plantas de cana-de-açúcar tolerantes ao déficit hídrico seria a utilização da transformação genética. Além disso, esta ferramenta viabilizaria o ganho de informações para o melhor entendimento dos mecanismos que envolvem a tolerância ao estresse. O uso desta tecnologia abre oportunidades para o aumento da tolerância pela incorporação de genes envolvidos na proteção ao estresse de alguma fonte dentro de plantas importantes para a agricultura.

O desenvolvimento de métodos de transformação para a introdução de transgenes em plantas envolve dois objetivos principais: a) melhoria genética racional de espécies agronomicamente importantes para o cultivo e b) melhor entendimento da expressão e função do gene nela introduzido. Entretanto, em certas espécies este procedimento representa um passo limitante, pois é necessário estabelecer um sistema de transformação bastante eficiente para ser usado como rotina no laboratório.

A transformação genética de cana-de-açúcar foi primeiramente obtida em 1992 por Bower; Birch (1992), através da técnica de biobalística. As plantas transformadas obtidas continham o gene *nptII*, que codifica para a enzima neomicina fosfotransferase II, a qual confere resistência a antibióticos aminoglicosídeos (canamicina e geneticina). No mesmo ano, Chowdhury; Vasil bombardearam calos embriogênicos de cana-de-açúcar com o gene *bar*, porém, não conseguiram regenerar nenhuma planta transgênica, provavelmente devido a idade e tipo de calo utilizado nos experimentos de transformação.

A transformação genética de cana-de-açúcar está ganhando espaço e sendo amplamente estudada. Atualmente, existem plantas transgênicas de cana-de-açúcar com diversas características de interesse comercial contendo o gene marcador de seleção *nptII* (GAMBLEY et al., 1993; BOWER et al., 1996; ARENCIBIA et al., 1998; ELLIOTT et al., 1998; CHENGALRAYAN et al., 2001); resistentes a herbicidas (CHOWDHURY; VASIL, 1992; GALLO-MEAGHER; IRVINE, 1996; ENRIQUEZ-OBREGON et al., 1998; LEIBBRANDT; SNYMAN, 2003), a insetos (ARENCIBIA et al., 1997, 1999), ao vírus do mosaico (INGELBRECHT et al., 1999; BUTTERFIELD et al., 2002), ao vírus Fiji (FDV) (McQUALTER et al., 2004), a bactéria causadora da escaldadura das folhas (ZHANG et al., 1999).

Foram obtidas plantas transgênicas tolerantes ao déficit hídrico (ZHANG et al., 2006), com alteração na atividade da enzima polifenol oxidase (PPO) e sacarose fosfato sintase (SPS) (VICKERS et al., 2005) e produção de ácido *p*-hidroxibenzóico (McQUALTER et al., 2005). A cana-de-açúcar transgênica também foi usada como plataforma para produção de um fator de estimulação humano GM-CSF empregado no tratamento da neutrofenia e anemia aplásica (WANG et al., 2005).

O método biobalístico, mesmo sendo atrativo para cana-de-açúcar, apresenta problemas quanto à complexidade de integração. Esse método pode gerar inserções múltiplas do transgene resultando em silenciamento ou instabilidade do transgene (LESSARD et al., 2002).

Arencibia et al (1998) e Elliot et al (1998) avaliaram o uso da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* como método alternativo na transformação genética de cana-de-açúcar. Entretanto, o espectro natural de hospedeiro desta bactéria definido como a habilidade de formar tumor, não inclui a maioria das monocotiledôneas, como a cana-de-açúcar. Assim, são fundamentais a otimização e adequação de protocolos visando o uso rotineiro desta técnica nos laboratórios.

1.5.1 Transformação para tolerância a estresses abióticos

Os estudos da expressão gênica induzida por estresses abióticos têm sido realizados principalmente em plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum*. Há pouca informação sobre genes expressos em plantas de cana-de-açúcar durante estresses abióticos, principalmente estresse hídrico. Essas informações são muito importantes em programas de melhoramento para tolerância ao estresse por déficit hídrico para serem usadas na obtenção de cultivares transgênicas com maior tolerância à seca.

O aumento da tolerância ao estresse por déficit hídrico através da transformação genética vem sendo obtido em várias espécies utilizando-se principalmente duas estratégias: introdução de genes envolvidos na síntese de moléculas osmoprotetoras ou através de genes codificando fatores de transcrição.

A estratégia de transferência de genes envolvidos na biossíntese de osmoprotetores, tais como manitol, prolina, trehalose e glicina betaína, tem mostrado ser efetiva para aumentar a tolerância a temperaturas extremas, salinidade, déficit hídrico e oxidação (BAJAJ et al., 1999; KISHOR et al., 2005).

Numerosos trabalhos têm sido feitos na tentativa de demonstrar a eficácia destes osmoprotetores na proteção da planta ou microrganismos submetidos a condições estressantes.

Com o uso do gene Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase (*P5CS*) podem-se citar inúmeros trabalhos mostrando sua capacidade de aumentar a tolerância de plantas a estresses abióticos como, por exemplo, a seca e o estresse salino. Plantas transgênicas de tabaco superexpressando o gene mutante *P5CS*, sob controle do promotor constitutivo CaMV 35S, produziram 5-6 vezes mais prolina do que as plantas não transformadas em condições normais. Em condições de estresse salino, plantas transformadas produziram três vezes mais prolina em comparação às plantas não-transgênicas, mostrando-se tolerantes a altas concentrações de NaCl (HONG et al., 2000).

O mesmo gene, porém, não mutante foi introduzido em arroz sob o controle de um promotor ABA-induzido. As plantas transgênicas de arroz acumularam 2,5 vezes mais prolina que as plantas controle sob condição de estresse. Resultados preliminares mostraram que a expressão induzida do gene *P5CS*, na segunda geração de plantas transgênicas de arroz, proporcionou um aumento da biomassa refletindo no aumento do peso fresco de raiz e da parte aérea sob condições de estresse hídrico e salino (ZHU et al, 1998).

Recentemente, foram obtidas plantas transgênicas de trigo produzindo altos níveis de prolina (SAWAHEL & HASSAN, 2002). Esses autores consideram que a partir da combinação do melhoramento convencional e de plantas transgênicas é possível produzir culturas tolerantes ao NaCl. Também, plantas do porta-enxerto citrange Carrizo, transformadas com o gene mutante *P5CS*, acumularam altas concentrações de prolina nas folhas e, conseqüentemente, apresentaram maior tolerância ao estresse hídrico (MOLINARI et al., 2004).

Plantas de tabaco transformadas com gene *mtID*, que codifica a enzima manitol-1-fosfato desidrogenase, mostraram maior acúmulo de manitol. Estas plantas apresentaram também aumento na tolerância a altas concentrações salinas comparado a plantas controle (TARCZYNSKY et al., 1993). Thomas et al., (1995) transformando plantas de *A. thaliana* com o mesmo gene verificaram que sementes transgênicas acumulavam manitol quando germinadas em presença de altas concentrações salinas, enquanto que sementes não transgênicas não germinavam nestas condições. Entretanto, Karakas et al. (1997) observaram que plantas transgênicas de tabaco transformadas com o gene *mtID* mostraram um

aumento em peso seco sob estresse salino, porém nenhuma diferença no crescimento pode ser verificada entre plantas transgênicas e o controle sob estresse hídrico. Além disso, foi observado que o acúmulo de manitol contribuiu muito pouco para o ajuste osmótico nas plantas de tabaco transgênicas.

Quanto à utilização do osmoprotetor glicina betaína, Lilius et al. (1996) introduziram em tabaco o gene *betA* de *E. coli* que codifica a enzima colina desidrogenase. Plantas transformadas com este gene mostraram-se mais tolerantes ao estresse salino quando comparadas ao controle. Posteriormente, o gene da enzima colina oxidase (*codA*) que converte colina a glicina betaína, isolado de *Arthrobacter globiformis*, foi introduzido em *A. thaliana*. Plantas transgênicas com este gene acumularam glicina betaína e mostraram aumento na tolerância aos estresses salino e frio (HAYASHI et al., 1997; ALIA et al., 1998). Sakamoto et al. (1998) mostraram também que plantas transgênicas de arroz superexpressando o gene *codA* foram mais tolerantes aos estresses salino e frio.

Um outro importante osmoprotetor é a trealose, um dissacarídeo não reduzido de glicose encontrado em bactérias, fungos, insetos. Somente no final da década passada foi identificada em plantas superiores (GODDIJIN et al., 1997). A dificuldade na identificação da trehalose, provavelmente, foi devido à alta atividade da enzima trehalase em plantas superiores (NEPOMUCENO et al., 2001). Plantas que produzem trealose são, na maioria das vezes, altamente tolerantes ao estresse por dessecação. O gene trealose-6-fosfato sintetase (*TPS1*) de levedura foi introduzido em tabaco. O acúmulo de trealose nas plantas mostrou múltiplas alterações fenotípicas e aumento na tolerância ao estresse hídrico (ROMERO et al., 1997). Pilon-Smits et al. (1998) introduziram o gene trealose-6-fosfato sintase (*otsA*) e trealose-6-fosfato fosfatase (*otsB*) de bactéria em tabaco. As folhas das plantas transgênicas se mostraram grandes, além de apresentarem melhor crescimento em termos de peso seco sob estresse hídrico, acumulando trealose acima de 0,17 mg por grama de peso fresco. Estas plantas também mostraram maior eficiência na atividade fotossintética.

Outro osmoprotetor são as frutanas que são moléculas de polifrutose produzidas por muitas plantas e bactérias. Devido à sua alta solubilidade, elas podem ajudar as plantas sobreviverem em períodos de estresse osmótico. Pilon-

Smits et al. (1995) introduziram um gene de bactéria codificando para frutana sintase (*sacB*) isolado de *Bacillus subtilis* em tabaco. Sob condições normais, a presença de frutana não apresentou efeitos significativos na taxa de crescimento e rendimento. Estas plantas transgênicas tiveram melhor performance sob estresse osmótico mediado por PEG (Poli Etileno Glicol) comparado a plantas controle e resistência ao estresse correlacionado com as quantidades de frutana acumulado.

A expressão de um cDNA codificando para outro osmoprotetor, o mio-inositol O-metiltransferase (IMT1), em tabaco durante estresse hídrico e salino resultou no acúmulo de inositol metilado (D-ononitol), o qual confere tolerância a ambos estresses (SHEVELEVA et al., 1997). Desde que o nível de D-ononitol alcance mais que 600 mM no citosol e ele não entre no vacúolo, seu acúmulo promove um balanço osmótico de Na^+ .

Poliaminas compreendem outro grupo de osmoprotetores, sendo pequenos e ubíquos componentes nitrogenados celulares que têm implicações em uma variedade de respostas ao estresse em plantas. Poliaminas são acumuladas sob algumas condições de estresse abiótico, incluindo estresse hídrico e salino. Cultivares que continham altos níveis de poliaminas demonstraram um decréscimo na tolerância ao estresse salino (GALSTON et al., 1997). A aplicação exógena de poliaminas proporcionou a folhas de aveia proteção contra o estresse osmótico (BESFORD et al., 1993). Minocha; Sun, (1997) mostraram que células transgênicas de cenoura superexpressando ornitina decarboxilase de rato, converteram ornitina para diamina putrescina, podendo assim resistir ao estresse osmótico e salino a um curto período de 0 a 48 horas. Capell et al. (1998) superexpressou o gene da arginina descaboxilase de aveia em arroz. Embora as plantas apresentassem aumento na tolerância à seca em termos de clorofila perdida sob estresse hídrico, a expressão constitutiva deste gene afetou severamente os padrões de desenvolvimento *in vitro*.

A segunda estratégia foi usada para a transformação de *Arabidopsis thaliana* com o fator de transcrição DREB1A, que se liga a uma região chamada de DRE, essencial para a expressão de genes responsivos ao estresse hídrico, aumentando a tolerância a vários estresses, entre os quais a seca (KASUGA et al., 1999).

Para análise de genes envolvidos na resposta a estresses abióticos são fundamentais a obtenção de plantas transformadas com construções quiméricas constituídas de seqüências regulatórias e um gene indicador (XIONG et al., 1999). Por sua excelente resposta a diversos sistemas de transformação, *A. thaliana* tem sido usada como planta modelo para a maioria dos estudos de tolerância a estresses abióticos (ZHU et al., 1997; HUANG et al., 2000; SCHOEREDER et al., 2001). Apesar da importância dos estudos realizados com plantas modelos, a utilização da espécie vegetal alvo evitaria diversos problemas resultantes da extrapolação de dados e permitiria que os resultados obtidos se transformassem em uma nova tecnologia mais rapidamente.

2 REFERÊNCIAS

ABE, H.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; URAO, T.; IWASAKI, T.; HOSOKAWA, D.; SHINOZAKI, K. Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought and abscisic acid-regulated gene expression. **Plant Cell** v.9, p.1859-1868, 1997.

ALCOPAR 2005 <http://www.alcpar.org.br/>, capturada em 10/05 2006.

ALIA, MOHANTY, P.; MATYSIK, J. Effect of proline on the production of singlet oxygen. **Amino Acids** v.21, p.195-200, 2001.

ALIA. **Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline**. In: 1st Annual User Meeting of the Free Radical Research Facility Daresbury, at Council for the Central Laboratory of the Research Councils, Daresbury, Cheshire, UK, 2003.

ARENCIBIA, A.; VAZQUEZ, R.I.; PRIETO, D.L.; TELLEZ, P.; CARMONA, E.R.; COEGO, A.; HERNANDEZ, L.; DE LA RIVA, G. A.; SELMAN-HOUSEIN, G. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. **Molecular Breeding** v.3, p.247-255, 1997.

ARENCIBIA, A.D.; CARMONA, E.R.; CORNIDE, M.T.; CASTIGLIONE, S.; O'REILLY, J.; CHINEA, A.; ORAMAS, P.; SALA, F. Somaclonal variation in insect resistant transgenic sugarcane (*Saccharum* hybrid) plants produced by cell electroporation. **Transgenic Research** v.8, p.349-360, 1999.

ARENCIBIA, A.D.; CARMONA, E.R.; TELLEZ, P.; CHAN, M.T.; YU, S.M.; TRUJILLO, L.E.; ORAMAS, P. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Research** v.7, p.213-222, 1998.

ARRUDA, P. Analysis, functional annotation and comparative genomics of 300,000 sugarcane ESTs reveal gene number, genome organization and evolution in higher plants. In: **7th International Congress of Plant Molecular Biology**, ISPMB, Barcelona /resumo/2003.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** v.50, p.601-639, 1999.

BAJAJ, S.; JAYAPRAKASH, T.; LIFREI, L.; HO, T. H. D.; WU, R. Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. **Molecular Breeding**. v.5, p.493-503. 1999.

BALLANTYNE, J.S.; CHAMBERLIN, M.E. Regulation of cellular amino acid levels. In: **Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation** (K Strange ed), CRC Press, Boca Raton, p.111-122. 1994.

BARBIERI, V.; VILLA NOVA, N.A. **Climatologia e a cana-de-açúcar**. Araras: PLANALSUCAR – Coordenadoria Regional Sul – COSUL. Climatologia, p.1-22, 1977.

BARTELS, D. Targeting detoxification pathways. An efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance? **Trends in Plant Science** v.6, p.284-286, 2001.

BASS, B. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. **Cell**, v. 101, p. 235-238, 2000.

BELHASSEN, E.; THIS, D. & MONNEVEUX, P. L'adaptation génétique face aux contraintes de sécheresse. **Cahiers Agricultures**, v.4, p.251-261. 1995.

BESFORD, R.T.; RICHARDSON, C.; CAMPOS, J.L.; TIBURCIO, A.F. Effects of polyamines on the stabilization of molecular complexes in thylacoid membranes of osmotically stressed oat leaves. **Planta** v.189, p.201-206. 1993.

BINZEL, M.L.; HASEGAWA, P.M.; RHODES, D.; HANDA, S.; HANDA, A.K.; BRESSAN, R.A. Solute accumulation in tobacco cells adapted to NaCl. **Plant Physiology** v.84, p.1408-1415. 1987.

BLUM, A. Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. **Plant Growth Regulation**. v.20, p.135-148. 1996.

BLUM, A.; MAYER, J. & GOZLAN, G. Associations between plant production and some physiological components of drought resistance in wheat. **Plant, Cell and Environment**. v.6, p.219-225. 1983.

BLUMWALD, E.; GROVER, A.; GOOD, A.G. **Breeding for abiotic stress resistance: challenges and opportunities**. In: New directions for a diverse planet. *Proceedings of the 4th International Crop Science Congress*, 26 Sep - 1 Oct 2004, Brisbane, Australia, [ttp://www.cropscience.org.au/icsc2004/pdf/1953_blumwalde.pdf](http://www.cropscience.org.au/icsc2004/pdf/1953_blumwalde.pdf), 2004.

BOGGESE, S.F.; ASPINALL, D.; PALEG, L.G. Stress metabolism IX. The significance of end-product inhibition of proline biosynthesis and of compartmentation in relation to stress-induced proline accumulation. **Australian Journal of Plant Physiology** v.3, p.513-525. 1976.

BOWEN, B.A. **Markers for plant gene transfer**. In: KUNG, S.; WU, R. (Eds.). *Transgenic plants*. San Diego: Academic Press, v.1, p. 89-123, 1993.

BOWER, R.; BIRCH, R.G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **Plant Journal** v.2, p.409-416, 1992.

BOWER, R.; ELLIOTT, A.R.; POTIER, B.A.M.; BIRCH, R.G. High-efficiency, microprojectile-mediated co-transformation of sugarcane, using visible or selectable markers. **Molecular Breeding** v.2, p.239-249, 1996.

BOWLER, C.; VAN MONTAGUE, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** v.43, p.83-116, 1992.

BOYER, J.S. Plant productivity and environment. **Science** v.218, p.443-448, 1982.

BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. **Transformação Genética de Plantas**. In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília: Embrapa, 1999.

BRAY, E.A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology** v.103, p.1035-1040. 1993.

BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B.; Jones, R. (eds.) **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p.1158-1203.

BRIENS, M.; LARHER, F. Osmoregulation in halophytic higher plants: a comparative study of soluble carbohydrates, polyols, betaines and free proline. **Plant and Cell Environment** v.5, p.287-292. 1982.

BULL, T. **The sugarcane plant**. In "Manual of cane growing", HOGARTH, M, ALLSOPP, P., eds. Bureau of Sugar Experimental Stations, Indooroopilly, Australia. p.71-83, 2000.

BURNER, D.M.; GRISHAM, M.P. Induction and stability of phenotypic variation in sugarcane as affected by propagation procedure. **Crop Science** v.35, p.875-880, 1995.

BUTTERFIELD, M.K.; IRVINE, J.E.; VALDEZ GARZA, M.; MIRKOV, T.E. Inheritance and segregation of virus and herbicide resistance transgenes in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics** v.104, p.797-803, 2002.

CAPELL, T.; ESCOBAR, C.; LIU, H.; BURTIN, D.; LEPRI, O.; CHRISTOU, P. Overexpression of the oat arginine decarboxylase cDNA in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) affects normal development patterns *in vitro* and results in putrescine accumulation in transgenic plants. **Theoretical and Applied Genetics** v.97, p.246-254. 1998.

CAYLEY, S.; LEWIS, B.A.; GUTTMAN, H.J.; RECORD, M.T.JR. Characterization of the cytoplasm of *Escherichia coli* K-12 as a function of external osmolarity. Implications for protein-DNA interactions *in vivo*. **Journal of Molecular Biology** v.222, p.281-300. 1991.

CHAMPIGNY, M.L. Integration of photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in higher plants. **Photosynthesis Research** v.46, n.1, p117-127, 1995.

CHAVES, M.M.; MAROCO, J.P.; PEREIRA, J.S. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology** v.30, p.239-264, 2003.

CHENGALRAYAN, K.; HAZRA, S.; GALLO-MEAGHER, M. Histological analysis of somatic embryogenesis and organogenesis induced from mature zygotic embryo-derived leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Science** v.161, p.415-421, 2001.

CHOWDHURY, M.K.U.; VASIL, I.K. Molecular analysis of plants regenerated from embryogenic cultures of hybrid sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.). **Theoretical and Applied Genetics** v.86, p.181-188, 1992.

CHOWDHURY, M.K.U.; VASIL, I.K. Stably transformed herbicide resistant callus of sugarcane via microprojectile bombardment of cell suspension cultures and electroporation of protoplasts. **Plant Cell Reports** v.11, p.494-498, 1992.

CLAUSSEN, W. Proline as a measure of stress in tomato plants. **Plant Science** v.168, p.241-248, 2005.

CSONKA, L.N. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. **Microbiology Review** v.53, p.121-147, 1989.

CSONKA, L.N.; HANSON, A.D. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. **Annual Review of Microbiology** v.45, p.569-606. 1991.

DALMAY, T.; HAMILTON, A.; RUDD, S.; ANGELL, S.; BAULCOMBE, D.C. An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for post-transcriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. **Cell** v. 101, p. 543-553, 2000.

DAMASCO, O.P.; GRAHAM, G.C.; HENRY, R.J.; ADKINS, S.W.; SMITH, M.K.; GODWIN, I.D. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish (*Musa* spp. AAA) bananas. **Plant Cell Reports** v.16, p.118-123, 1996.

DE RONDE, J. A.; CRESS, W. A.; KRUGER, G. H. J.; STRASSER, R. J.; VAN STADEN, J. Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis* P5CR gene, during heat and drought stress. **Journal of Plant Physiology** v.161, p.1211-1224, 2004.

DEBLOCK, M.; BOTTERMAN, J.; VANDIRWIELE, M.; DOCKX, J.; THOEN, C. Engineering herbicide resistance in plants by expression of detoxifying enzyme. **EMBO Journal** v.6, p.2513-2518, 1987.

DELAUNEY, A.J.; HU, C.A.; KAVI KISHOR, P.B.; VERMA, D.P.S. Cloning of ornithine δ -aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by *trans*-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. **The Journal of Biological Chemistry** v.268, p.18673-18678, 1993.

DELAUNEY, A.J.; VERMA, D.P.S. A soybean delta¹-pyrroline-5-carboxylate reductase gene was isolated by functional complementation in *Escherichia coli* and is found to be osmoregulated. **Molecular Genomics and Genetics** v.221, p.299-305. 1990.

DELAUNEY, A.J.; VERMA, D.P.S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **The Plant Journal** v.4, p.215-223. 1993.

DERISI, J.L.; IYER, V.R.; BROWN, P.O. Exploring the metabolic and genomic control of gene expression on a genomic scale. **Science** v.278, p.680-686, 1997.

DEUTCH A.H., SMITH C.J., RUSHLOW K.E. Analysis of the *Escherichia coli* *proBA* locus by DNA and protein sequencing. **Nucleic Acids Research** v.12, p.6337-6355. 1984.

D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; RAO, S.; BERDING, N.; GLASZMANN, J.C. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular Genetics and Genomics** v.250, p.405-413, 1996.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y-F.C.; CAMPBELL, A.P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E.D.; SIEBERT, P.D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of National Academy of Sciences USA** v.93, p.6025-6030, 1996.

DÍAZ, P.; BORSANI, O.; MONZA, J. Acumulación de prolina en plantas en respuesta al estrés osmótico. **Agrociencia**. v.3, n.1, p.1-10. 1999.

DOOREMBOS, J.; KASSAN, A.H. **Efectos del agua sobre el rendimiento de los cultivos**. Roma. FAO, 1979. 212p. (FAO. Riego y Drenaje, 33).

DORFFLING, K.; DORFFLING, H.; LESSELICH, G. *In vitro*-selection and regeneration of hydroxyproline-resistant lines of winter wheat with increased proline content and increased frost tolerance. **Journal of Plant Physiology** v.142, p.222-225. 1993.

EDREVA, A. The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. **Agriculture Ecosystems & Environment** v.106, p.135-146, 2005.

ELLIOTT, A.R.; CAMPBELL, J.A.; BRETTELL, R.I.S.; GROF, C.P.L. *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane using GFP as a screenable marker. **Australian Journal of Plant Physiology** v.25, p.739-743, 1998.

ELSTNER, E.F. **Metabolism of activated oxygen species**. In: Davies DD, ed. Biochemistry of plants, London: Academic Press v.11, p.11253-11315, 1987.

ELTHON, T.E.; STEWART, C.R. Proline oxidation in corn mitochondria. **Plant Physiology** v.70, p.567-572. 1982.

ENRIQUEZ-OBREGON, G.A.; VAZQUEZ-PADRON, R.I.; PRIETO-SAMSONOV, D.L.; DE LA RIVA, G.A.; SELMAN-HOUSEIN, G. Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Planta** v.206, p.20-27, 1998.

EPSTEIN, E.; RAINS, D.W. Advances in salt tolerance. **Plant and Soil** v.99, p.17-29, 1987.

ESTERBAUER, H.; DIEBER-ORTHENERDER, M.; WAEG, G.; STRIEGL, G.; JURGENS, G. Biochemical, structural, and functional properties of oxidized low density lipoprotein. **Chemical Research in Toxicology** v.3, p.77-92, 1990.

FAGARD, M.; BOUTET, S.; MOREL, J.B.; BELLINI, C.; VAUCHERET, H. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for posttranscriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA** v.97, p.11650-11654, 2000.

FLOYD, R.A.; NAGY, Z.S. Formation of long-lived hydroxyl free radical adducts of proline and hydroxyproline in a Fenton reaction. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.790, p.94-97, 1984.

FRALEY, R.T.; ROGERS, S.G.; HORSCH, R.B.; SANDERS, P.R.; FLICK, J.S.; ADAMS, S.P.; BITTNER, M.L.; BRAND, L.A.; FINK, C.L.; FRY, J.S.; GALLUPPI, G.R.; GOLDBERG, S.B.; HOFFMANN, N.L.; WOO, S.C. Expression of bacterial genes in plant cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA** v.80, p.4803-4807, 1983.

FUJITA, M.; FUJITA, Y.; MARUYAMA, K.; SEKI, M.; HIRATSU, K.; OHME-TAKAGI, M.; TRAN, L.S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A dehydration-induced NAC protein, RD26 is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. **Plant Journal** v.39, p.863-876, 2004.

FUKUTOKU, Y.; YAMADA, Y. Sources of proline-nitrogen in water-stressed soybean (*Glycine max*). II. Fate of ¹⁵N-labelled protein. **Physiologia Plantarum** v.61, p.622-628, 1984.

GALLO-MEAGHER, M.; IRVINE, J.E. Herbicide resistant transgenic sugarcane plants containing the *bar* gene. **Crop Science** v.36, p.1367-1374, 1996.

GALSTON, A.W.; KAUR-SAWHNEY, R.; ALTABELLA, T.; TIBURCIO, A.F. Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. **Bot. Acta.** v.110, p.197-207. 1997.

GAMBLEY, R.L.; FORD, R.; SMITH, G.R. Microprojectile transformation of sugarcane meristems and regeneration of shoots expressing-Glucuronidase. **Plant Cell Reports** v.12, p.343-346, 1993.

GASCHO, G.J.; SHIH, S.F. **Sugarcane**. In: Teare, I.D.; Peet, M.M. (Ed.). Crop-Water relations. New York: John Wiley, p.445-479, 1983.

GENARD, H.; LE SAOS, J.; BILLARD, J.P.; TRIMOLIERES, A.; BAUCAUD, J. Effect of salinity on lipid composition, glycine betaine content and photosynthetic activity in chloroplasts of *Suaeda maritima*. **Plant Physiology and Biochemistry** v.29, p.421-427, 1991.

GIBSON, S.; SOMERVILLE, C. Isolating plant genes. **Trends in Biotechnology** v.11, p.306-312, 1993.

GILBERT, D.L.; SAUNDERS, S.J.; BARBEZAT, G.O.; WITHMAN, W. **Oxygen and living processes**, interdisciplinary approach. Springer N.Y, 1981.

GIROUSSE, C.; BOURNOVILLE, R.; BONNEMAIN, J.L. Water deficit-induced changes in concentrations in proline and some other amino acids in the phloem sap of alfalfa. **Plant Physiology** v.111, p.109-113. 1996.

GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual Review of Plant Physiology** v.31, p.149-190, 1980.

GRESSEL, J.; GALUN, E. **Genetic controls of photooxidant tolerance**. In: C. H. FOYER AND P. M. MULLINEAUX (eds). Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. CRC Press Inc. Boca Raton, FL, USA. pp. 237-273, 1994.

GULTINAN, M.J.; MARCOTTE, W.R. JR.; QUATRANO, R.S. A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. **Science** v.250, p.267-271, 1990.

HADI, M.Z.; MCMULLEN, M.D.; FINER, J.J. Transformation of 12 Different Plasmids into Soybean via Particle Bombardment. **Plant Cell Reports** Berlin, 15: 500-505, 1996.

HANDA, S.; HANDA, A.K.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stress. **Plant Physiology** v.80, p.938-945, 1986.

HARE, P.D.; CRESS, W.A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation** v.21, p.79-102, 1997.

HARE, P.D.; CRESS, W.A.; VAN STADEN, J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. **Plant Cell Environment** v.21, p.535-553, 1998.

HARE, P.D.; CRESS, W.A.; VAN STADEN, J. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. **Journal of Experimental Botany** v.50, p.413-434, 1999.

HARE, P.D.; CRESS, W.A.; VAN STADEN, J. Disruptive effects of exogenous proline on chloroplast and mitochondrial ultrastructure in *Arabidopsis* leaves. **South Africa Journal of Botany** v.68, p.393-396, 2002.

HAYASHI, H.; ALIA; MUSTARDY, L.; DESHNIUM, P.; IDA, M.; MURATA, N. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase: accumulation of glycine betaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. **The Plant Journal** v.12, p.133-142, 1997.

HENDRE, R.R.; IYER, R.S.; KOTWAL, M.; KHUSPE, S.S.; MASCARENHAS, A.F. Rapid multiplication of sugarcane by tissue culture. **SugarCane** v.1, p.5-8, 1983.

HMIDA-SAYARI, A.; GARGOURI-BOUZID, R.; BIDAN, A.; JAOUA, L.; SAVOURE, A.; JAOUA, S. Overexpression of pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. **Plant Science** v.196, p.746-752, 2005.

HOGARTH, D. M. **Genetics of sugarcane**. In: D. J. HEINZ (ed), Sugarcane Improvement Through Breeding. Elsevier, New York. p.255-272, 1987.

HOLLUNG, K.; ESPELUND, M.; SCHOU, K.; JAKOBSEN, K.S. Developmental, stress and ABA modulation of mRNA levels for bZIP transcription factors and Vp1 in barley embryos and embryo-derived suspension cultures. **Plant Molecular Biology** v.35, p.561-571, 1997.

HOLMES-DAVIS, R., COMAI, L. Nuclear matrix attachment regions and plant gene expression. **Trends in Plant Science** v.3, p.91-97, 1998.

HONG, Z.; LAKKINENI, K.; ZHANG, Z.; VERMA, D.P.S. Removal of feedback inhibition of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. **Plant Physiology** v.122, p.1129-1136, 2000.

HONG-QI, Z.; CROES, A.F.; LINSKENS, H.F. Protein synthesis in germinating pollen of *Petunia*: role of proline. **Planta** v.154, p.199-203, 1982.

HSIAO, T.C. Plant response to water stress. **Plant Physiology** v.24, p.519-570, 1973.

HU, C.A.A.; LIN, W.W.; VALLE, D. Cloning, characterization and expression of cDNAs encoding human Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase. **Journal of Biological Chemistry** v.271, p.9795-9800, 1996.

HUA, X-J.; VAN DE COTTTE, B.; VAN MONTAGU, M.; VERBRUGGEN, N. Developmental regulation of pyrroline-5-carboxylate reductase gene expression in *Arabidopsis*. **Plant Physiology** p.1215-1224. 1997.

HUANG, J.; HIRJI, R.; ADAMS, L.; ROZWADOWSKI, K.L.; HAMMERLINDI, J.K.; KELLER, W.A.; SELVARAJ, G. Genetic engineering of glycine betaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. **Plant Physiology** v.122, p.747-756, 2000.

HWANG, I.T.; KIM, Y.J.; KIM SH.; KWAK, C.I.; GU, Y.Y.; CHUN J.Y. Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification **BioTechniques** v.35, p.1180-1184, 2003.

IEA. 2000. <http://www.iea.sp.gov.br/>, capturada em 14/12 2000.

INGELBRECHT, I.L.; IRVINE, J.E.; MIRKOV, T.E. Post transcriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. **Plant Physiology** v.119, p.1187-1197, 1999.

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology** v.47, p.377-403, 1996.

IRVINE, J.E. The frequency of marker changes in sugarcane plants regenerated from callus culture, II. Evidence for vegetative and genetic transmission, epigenetic effects and chimera disruption. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** v.26, p.115-125, 1991.

IRVINE, J.E.; BENDA, G.T.A.; LEGENDRE, B.L.; MACHADO, J.R. The frequency of marker changes in sugarcane plants regenerated from callus culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** v.3, p.201-209, 1984.

JONES, M.M.; OSMOND, C.B.; TURNER, N.C. Accumulation of solutes in leaves of sorghum and sunflower in response to water deficits. **Australian Journal of Plant Physiology** v.7, p.193-205. 1980.

KARAKAS, B.; OZIAS-AKINS, P.; STUSHNOFF, C.; SUEFFERHELD, M.; RIEGER, M. Salinity and drought tolerance of mannitol-accumulation transgenic tobacco. **Plant and Cell Environment**. v.20, p.609-616. 1997.

KASAI, H.; CRAIN, P.F.; KUCHINO, Y.; NISHIMURA, S.; OOTSUYAMA, A.; TANOOKA, H. Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. **Carcinogenesis** v.7, p.1849-1851, 1986.

KASUGA, M.; LIU, Q.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature Biotechnology** v.17, p.287-291, 1999.

KAVH-KISHOR, P.B.K.; HONG, Z.; MIAO, G-H.; HU, C.A.A.; VERMA, D.P.S. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiology** v.108, p.1387-1394, 1995.

KETCHUM, R.E.B.; WARREN, R.C.; KLIMA, L.J.; LOPEZ-GUTIERREZ, F.; NABORS, M.W. The mechanism and regulation of proline accumulation in suspension cultures of the halophytic grass *Distichlis spicata* L. **Journal of Plant Physiology** v.137, p.368-374. 1991.

KIKUCHI, K.; UEGUCHI-TANAKA, M.; YOSHIDA, K.T.; NAGATO, Y.; MATSUSOKA, M.; HIRANO, H.Y. Molecular analysis of the *NAC* gene family in rice. **Molecular and General Genetics** v.262, p.1047-1051, 2000.

KISHOR, P.B.K. et al., Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science** v.88, p.424-438, 2005.

KIYOSUE, T.; YOSHIBA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A nuclear gene, encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. **The Plant Cell** v.8, p.1323-1335. 1996.

KREUGER, R.; JAGER, H.J.; HINTZ, M.; PAHLICH, E. Purification to homogeneity of pyrroline-5-carboxylate reductase of barley. **Plant Physiology** v.80, p.142-144. 1986.

KUEH, J.S.H.; BRIGHT, S.W.J. Proline accumulation in a barley mutant resistant to *trans*-4-hydroxy-L-proline. **Planta**. v.153, p.166-171. 1981.

LANSAC, A.R.; SULLIVAN, C.Y.; JOHNSON, B.E. Accumulation of free proline in sorghum (*Sorghum bicolor*) pollen. **Canadian Journal of Botany** v.74, p.40-45. 1996.

LAROSA, P.C.; RHODES, D.; RHODES, J.C.; BRESSAN, R.A.; CSONKA, L.N. Elevated accumulation of proline in NaCl-adapted tobacco cells is not due to altered δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase. **Plant Physiology** v.96, p.245-250. 1991.

LAWLOR, D.W. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. **Annals of Botany** v.89, p.871-885, 2002.

LAWLOR, D.W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant and Cell Environment** v.25, p.275-294, 2002.

LEIBBRANDT, N.B.; SNYMAN, S.J. Stability of gene expression and agronomic performance of a transgenic herbicide-resistant sugarcane line in South Africa. **Crop Science** v.43, p.671-677, 2003.

LESSARD, P.A.; KULAVEERASINGAM, H.; YORK, G.M.; STRONG, A.; SINSKEY, A.J. Manipulation gene expression for the metabolic engineering of plants. **Metabolic Engineering**. v.4, p.67-79. 2002.

LILIUS, G.; HOLMBERG, N.; BULOW, L. Enhanced NaCl stress tolerance in transgenic tobacco expressing bacterial choline dehydrogenase. **Biotechnology** v.14, p.177-180. 1996.

LIU, J; LIU, J.D.; YUAN, Z.Q.; QIAN, X.Y.; QIAN, M. & YANG, J.S. Isolation and identification of genes expressed differentially in rice inflorescence meristem with suppression subtractive hybridization. **Chinese Science Bulletin** v.46, p.98-101, 2001.

LIU, Q.; KASUGA, M.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA-binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. **Plant Cell** v.10, p.1391-1406, 1998.

LONE, M.I.; KUEH, J.S.H.; WYN JONES, R.G.; BRIGHT, S.W.J. Influence of proline and glycinebetaine on salt tolerance of cultured barley embryos. **Journal of Experimental Botany** v.38, p.479-490. 1987.

LOW, P.S. Molecular basis of the biological compatibility of nature's osmolytes. In: **Transport Processes, Ion and Osmoregulation** (R Gilles, M Gilles-Baillien eds), Springer-Verlag, Berlin. p.469-477. 1985.

LUDLOW, M.M.; SANTAMARIA, J.M. & FUKAI, S. Contribution of osmotic adjustment to grain yield in *Sorghum bicolor* (L.) Moench under water-limited conditions. II. Water stress after anthesis. **Australian Journal of Agricultural Research** v.41, p.67-78. 1990.

LUTTS, S.; MAJERUS, V.; KINET, J.M. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. **Physiologia Plantarum** v.105, n.3, p.450-458. 1999.

MAGGIO, A. et al. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? **Plant Journal** v.31, p.699-712, 2002.

MANI, S.; VAN DE COTTE, B.; VAN MONTAGU, M.; VERBRUGGEN, N. Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in Arabidopsis. **Plant Physiology** v.128, p.73-83, 2002.

MATYSIK, J.; ALIA, BHALU, B.; MOHANTY, P. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. **Current Science** v.82, p.525-532, 2002.

MCKERSIE, B.D.; LESHEM, Y.Y. **Stress and stress coping in cultivated plants**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, 1994.

MCKERSIE, B.D.; MURNAGHAN, J.; JONES, K.S.; BOWLEY, S.R. Iron-superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. **Plant Physiology** v.122, p.1427-1438, 2000.

MCQUALTER, R.B.; CHONG, B.F.; MEYER, K.; VAN DYK, D.E.; O'SHEA, M.G.; WALTON, N.J.; VIITANEN, P.V.; BRUMBLEY, S.M. Initial evaluation of sugarcane as a production platform for *p-hydroxybenzoic* acid. **Plant Biotechnology Journal** v.3, p.29-41, 2005.

MCQUALTER, R.B.; DALE, J.L.; HARDING, R.M.; MCMARON, J.A.; SMITH, G.R. Production and evaluation of transgenic sugarcane containing a Fiji disease virus (FDV) genome segment S9-derived synthetic resistance gene. **Australian Journal of Agricultural Research** v.55, p.139-145, 2004.

MENKES, A.E.; SCHINDLER, U.; CASHMORE, A.R. The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. **Trends in Biochemical Sciences** v.20, p.506-510, 1995.

MILNER-WHITE, E.J.; BELL, L. II AND MACCALUM, P. II. **Journal of Molecular Biology** v.228, p.725-734. 1992.

MINOCHA, S.C.; SUN, D-Y. Stress tolerance in plants through transgenic manipulation of polyamine biosynthesis. **Plant Physiology** v.297. supplement 1997.

MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science** v.7, p.405-410, 2002.

MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; BESPALHOK J. C.; KOBAYASHI, A. K.; PILEGGI, M.; PEREIRA, F. P. P.; VIEIRA, L. G. E. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science** v.167, p.1375-1381, 2004.

MORAN, J.F.; BECANA, M.; ITURBE-ORMAETXE, I.; FRECHILLA, S.; KLUCAS, R.V.; APARICIO-TEJO, P. Drought induces oxidative stress in pea plants. **Planta** v.194, p.346-352, 1994.

MORGAN, J.M. Osmoregulation and water stress in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology** v.35, p.299-319. 1984.

MUNDY, J.K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, CHUA, N-H. Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice *rab* gene. **Proceedings of National Academy of Science USA** v.87, p.1406-1410, 1990.

NAKAGAWA, H.; OHMIYA, K.; HATTORI, T. A rice bZIP protein, designated OSBZ8, is rapidly induced by abscisic acid. **Plant Journal** v.9, p.217-227, 1996.

NAKASHIMA, K.; SATOH, R.; KIYOSUE, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of Arabidopsis. **Plant Physiology** v.118, p.1233-1241, 1998.

NANJO, T.; FUJITA, M.; SEKI, M.; KATO, T.; TABATA, S.; SHINOZAKI, K. Toxicity of free proline revealed in an Arabidopsis T-DNA-tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. **Plant Cell Physiology** v.44, p.541-548, 2003.

NANJO, T.; KOBAYASHI, M.; YOSHIBA, Y., SANADA, Y.; WADA, K.; TSUKAYA, H.; KAKUBARI, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal** v.18, p.185-193. 1999.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** v.49, p.249-279, 1998.

OBER, E.S.; SHARP, R.E. Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. I. Requirement for increased levels of abscisic acid. **Plant Physiology** v.105, p.981-987. 1994.

OIA 2006 <http://www.isosugar.org/>, capturada em 10/05 2006.

OMETO, J.C. **Parâmetros meteorológicos e a cultura da cana-de-açúcar**. Piracicaba: ESALQ, 1980. 17p.

ORTOLANI, A.A.; PAES DE CAMARGO, M.B. **Influência dos fatores climáticos na produção**. In: CASTRO, P.R.C.; FERREIRA, S.O.; YAMADA, T. (Ed.). Ecofisiologia da produção agrícola. Piracicaba: Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato, p.71-79, 1987.

PAHLICH, E.; KERRES, R.; JAGER, H-J. Influence of water stress on the vacuole/extravacuole distribution of proline in protoplasts of *Nicotiana rustica*. **Plant Physiology** v.72, p.590-591. 1993.

PASTORI, G.M.; FOYER, C. Common components, networks and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of 'redox' and abscisic acid-mediated controls. **Plant Physiology** v.129, p.460-468, 2002.

PENG, Z.; LU, Q.; VERMA, D.P.S. Reciprocal regulation of delta¹-pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes control proline levels during and after osmotic stress in plants. **Molecular Genomics and. Genetics** v.253, p.334-341. 1996.

PENG, Z.; LU, Q.; VERMA, D.P.S. Reciprocal regulation of delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. **Molecular and General Genetics** v.253, p.334-341, 1996.

PHANG, J.M. The regulatory functions of proline and pyrroline-5-carboxylic acid. **Current Topics in Cell Regulation** v.25, 91-132, 1985.

PILON-SMITS, E.A.H.; TERRY, N.; SEARS, T.; KIM, H.; ZAYED, A.; HWANG, S.; VAN DUN, K.; VOOGD, E.; VERWOERD, T.C.; KRUTWAGEN, R.W.H.H.; GODDIJIN, O.J.M. Trehalose-producing transgenic tobacco plant show improved growth performance under drought stress. **Journal of Plant Physiology** v.152, p.525-532. 1998.

PILON-SMITS, E.A.H.; TERRY, N.; SEARS, T.; KIM, H.; ZAYED, A.; HWANG, S.; VAN DUN, K.; VOOGD, E.; VERWOERD, T.C.; KRUTWAGEN, R.W.H.H.; GODDIJIN, O.J.M. Trehalose-producing transgenic tobacco plant show improved growth performance under drought stress. **Journal of Plant Physiology** v.152, p.525-532. 1998.

PITCHER, L.H.; ZILINSKAS, B.A. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in the cytosol of transgenic tobacco confers partial resistance to ozone-induced foliar necrosis. **Plant Physiology** v.110, p.583-588, 1996.

PRICE, A.H.; ATHERTON, N.M.; HENDRY, G.A.F. Plants under drought-stress generated activated oxygen. **Free Radical Research Community** v.8, p.61-66, 1989.

PRICE, A.H.; HENDRY, G.A.F. Iron-catalyzed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. **Plant Cell Environment** v.14, p.477-484, 1991.

RAYAPATI, P.J.; STEWART, C.R. Solubilization of a proline dehydrogenase from maize (*Zea mays* L.) mitochondria. **Plant Physiology** v.95, p.787-791. 1991.

REDDY, A.R.; CHAITANYA, K.V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology** v.161, p.1189-1202, 2004.

RENTSCH, D.; HIRNER, B.; SCHMEIZER, E.; FROMMER, W.B. Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant. **The Plant Cell** v.8, p.1437-1446, 1996.

RHODES, D.; HANDA, S. Amino acid metabolism in relation to osmotic adjustment in plant cells. In: **Environmental Stress in Plants: Biochemical and Physiological Mechanisms**, NATO ASI Series, (JH Cherry ed), Springer, Berlin, v.G19, p. 41-62. 1989.

RIZHSKY, L.; LIANG, H.; SHUMAN, J.; SHULAEV, V.; DAVLETOVA, S.; MITTLER, R. When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. **Plant Physiology** v.134, p.1683-1696, 2004.

ROACH, B.T. Case for a core collection of sugarcane germplasm. **Proceedings of International Society of Sugar Cane Technology** v.21, p.339-350, 1995.

RONTEIN, D.; DIEUAIDE-NOUBHANI, M.; DUFOURC, E.J.; RAYMOND, P.; ROLIN, D. The metabolic architecture of plant cells: stability of central metabolism and flexibility of anabolic pathways during the growth cycle of tomato cells. **Journal of Biological Chemistry** v.277, p.43948-43960, 2002.

ROOSENS, N.H.; BITAR, F.A.I.; LOENDERS, K.; ANGENON, G.; JACOBS, M. Overexpression of ornithine- δ -aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. **Molecular Breeding** v. 9, p.73-80, 2002.

ROOSENS, N.H.; BITAR, F.A.I.; LOENDERS, K.; ANGENON, G.; JACOBS, M. Overexpression of ornithine- δ -aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. **Molecular Breeding** v. 9, p.73-80. 2002.

RUDOLPH, A.S.; CROWE, J.H.; CROWE, L.M. Effects of three stabilizing agents - proline, betaine and trehalose - on membrane phospholipids. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v.245, p.134-143, 1986.

SAIRAM, R.K.; DESHMUKH, P.S.; SAXENA, D.C. Role of antioxidant systems in wheat genotype tolerance to water stress. **Biologia Plantarum** v.41, p.387-394, 1998.

SAKAMOTO, A.; ALA; MURATA, N. Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycine betaine and tolerance to salt and cold. **Plant Molecular Biology** v.38, p.1011-1019. 1998.

SAKAMOTO, A.; MURATA, N. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. **Journal of Experimental Botany** v.51, p.81-88, 2000.

SAVOURE, A.; HUA, X-J.; BERTAUCHE, N.; VAN MONTAGU, M.; VERBRUGGEN, N. Absciscic acid-independent and absciscic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Genomics and Genetics** v.254, p.104-109, 1997.

SAWAHEL, W.A.; HASSAN, A.H. Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline. **Biotechnology Letters** v.24, p.721-725. 2002.

SCHOEREDER, J.I.; KWAK, J.M.; ALLEN G.J. Guard cell abscisic acid signaling and engineering drought hardness in plants. **Nature** v.410, n.15, p.327-330, 2001.

SCHWAB, K.B.; GAFF, D.F. Influence of compatible solutes on soluble enzymes from desiccation-tolerant *Sporobolus stapfianus* and desiccation-sensitive *Sporobolus pyramidalis*. **Journal of Plant Physiology** v.137, p.208-215, 1990.

SCHWACKE, R.; GRALLATH, S.; BREITKREUZ, K.E.; STRANSKY, E.; STRANSKY, H.; FROMMER, W.B.; RENTSCH, D. LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and gamma-amino butyric acid in tomato pollen. **The Plant Cell** v.11, p.377-391. 1999.

SEKI, M.; KAMEI, A.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. **Current Opinion of Biotechnology** v.14, p.194-199, 2003.

SELLS, G.D.; KOEPPE, D.E. Oxidation of proline by mitochondria isolated from water-stressed maize shoots. **Plant Physiology** v.68, p.1058-1063. 1981.

SERRAJ, R.; SINCLAIR, T.R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant and Cell Environment** v.25, p.333-341, 2002.

SGHERRI, C.L.M.; NAVARRI-IZZO, F. Sunflower seedlings subjected to increasing water deficit stress: oxidative stress and defence mechanisms. **Physiologia Plantarum** v.93, p.25-30, 1995.

SHARP, R.E.; BOYER, J.S.; NGUYEN, H.T.; HSIAO, T.C. Genetically engineered plants resistant to soil drying and salt stress: how to interpret osmotic relations. **Plant Physiology** v.110, p.1051-1053, 1996.

SHEN, Q.; HO, T.H.D. Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent response complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. **Plant Cell** v.7, p.295-307, 1995.

SHEN, Q.; ZHANG, P.; HO, T.H.D. Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: Composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in Barley. **Plant Cell** v.8, p.1107-1119, 1996.

SHEVELEVA, E.; CHMARA, W.; BOHNERT, H.J.; JENSEN, R.G. Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. **Plant Physiology** v.115, p.1211-1219. 1997.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water stress response. **Plant Physiology** v.115, p.327-334, 1997.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants. **Biotechnology Intelligence Unit 1**. Austin, Texas, U.S.A. p. 11-25, 1999.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: difference and cross-talk between two stress signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology** v.3, p.217-223, 2000.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Current Opinion in Plant Biology** v.6, p.410-417, 2003.

SIEMENS, J.; SCHIEDER, O. Transgenic Plants: genetic transformation-recent developments and the state of art. **Plant Tissue Culture & Biotechnology, Rehovot** v.2 p.66-75, 1996.

SIVAKUMAR, P.; SHARMILA, P.; SARADHI, P. Proline suppresses Rubisco activity in higher plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.252, p.428-432, 1998.

SMIRNOFF, N. Plant resistance to environmental stress. **Current Opinion of Biotechnology** v.9, p.214-219, 1998.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q.J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry** v.28, p.1057-1060, 1989.

SMITH C.J., DEUTCH A.H., RUSHLOW K.E. Purification and characteristics of a gamma-glutamyl kinase involved in *Escherichia coli* proline biosynthesis. **Journal of Bacteriology** v.157, p.545-551, 1984.

SOMERO, G.N. Protons, osmolytes, and fitness of internal milieu for protein function. **American Journal of Physiology** v.251, p.197-213. 1986.

SONGSTAD, D.D.; DUNCAN, D.R.; WIDHOLM, J.M. Proline and polyamine involvement in chilling tolerance of maize suspension cultures. **Journal of Experimental Botany** v.41, p.289-294. 1990.

SRINIVAS, V.; BALASUBRAMANIAN, D. Proline is a protein-compatible hydrotrope. **Langmuir** v.11, p.2830-2833. 1995.

STOCKINGER, E.J.; GILMOUR, S.J.; THOMASHOW, M.F. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a *cis*-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. **Proceedings of National Academy of Science USA** v.94, p.1035-1040, 1997.

SUGIHARTO, B. Biochemical and molecular studies on sucrose-phosphate synthase and drought inducible-protein in sugarcane (*Saccharum officinarum*) **Journal ILMU DASAR** v.5, p.62-67, 2004.

SZOKE, A.; MIAO, G.H.; HONG, Z.; VERMA, D.P.S. Subcellular location of delta¹-pyrroline-5-carboxylate reductase in root/nodule and leaf of soybean. **Plant Physiology** v.99, p.1642-1649. 1992.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.449-484.

TAL, M.; KATZ, A. Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato: the effect of proline on the growth of callus tissue of *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* under salt and water stress. **Z. Pflanzenphysiol.** v.98, p.283-288. 1980.

TANGPREMSRI, T.; FUKAI, S.; FISCHER, K.S. & HENZELL, R.G. Genotypic variation in osmotic adjustment in grain sorghum. 2. Relation with some growth attributes. **Australian Journal of Agricultural Research** v.42, p.759-767. 1991.

TARCZYNSKI, M.C.; JENSEN, R.G.; BORNERT, H.J. Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. **Science** v.259, p.508-510. 1993.

THOMAS, J.C.; BOHNERT, H.J. Salt Stress Perception and Plant Growth Regulators in the Halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. **Plant Physiology** v.103, p.1299-1304, 1993.

THOMAS, J.C.; DE ARMOND, R.L.; BOHNERT, H.J. Influence of NaCl on growth, proline, and phosphoenolpyruvate carboxylase levels in *Mesembryanthemum crystallinum* suspension cultures. **Plant Physiology** v.98, p.626-631. 1992.

TIMASHEFF, S.N. The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? **Annual Review of Biophysical and Biomolecular Structure** v.22, p.67-97. 1993.

TREICHEL, S. The influence of NaCl on delta¹-pyrroline-5-carboxylate reductase in proline-accumulating cell suspension cultures of *Mesembryanthemum nodiflorum* and other halophytes. **Plant Physiology** v.67, p.173-181. 1986.

TURNER, N.C.; JONES, M.M. **Turgor maintenance by osmotic adjustment: A review and evaluation.** In: Adaptation of plants to water and high temperature stress, TURNER, N.C. AND KRAMER, P.J., (eds.), Wiley, New York, p.87-103, 1980.

UNICA 2006. <http://www.unica.com.br/>, capturada em 10/05 2006.

VERBRUGGEN, N.; HUA, X.J.; MAY, M.; VAN MONTAGU, M. Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: evidence for a negative transcriptional regulator. **Proceedings of National Academy of Science USA** v.93, p.8787-8791, 1996.

VERBRUGGEN, N.; VILLARROEL, R.; VAN MONTAGU, M. Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology** v.103, p.771-781. 1993.

VETTORE A.L.; SILVA, F.R. DA; KEMPER, E.L.; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology** v.24, p.1-7, 2001.

VICKERS, J.E.; GROF, C.P.L.; BONNETT, G.D.; JACKSON, P.A.; KNIGHT, D.P.; ROBERTS, S.E.; ROBINSON, S.P. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic sugarcane results in darker juice and raw sugar. **Crop Science** v.45, p.354-362, 2005.

VOETBERG, G.S.; SHARP, R.E. Growth of the maize primary root tip at low water potentials. III. Role of increased proline deposition in osmotic adjustment. **Plant Physiology** v.96, p.1125-1130. 1991.

WANG, M.L.; GOLDSTEIN, C.; SU, W.; MOORE, P.H.; ALBERT, H.H. Production of biologically active GM-CSF in sugarcane: a secure biofactory. **Transgenic Research** v.14, p.167-178, 2005.

WILLIAMSON, C.L.; SLOCUM, R.D. Molecular cloning and evidence for osmoregulation of the delta¹-pyrroline-5-carboxylate reductase (*proC*) gene in pea (*Pisum sativum* L.). **Plant Physiology** v.100, p.1464-1470, 1992.

WOLFF, S.P.; GARNER, A.; DEAN, R.T. Free radicals, lipids and protein degradation. **Trends Biochemical Science** v.11, p.27-31, 1986.

WYN JONES, R.G.; STOREY, R.; LEIGH, R.A.; AHMAD, N.; POLLARD, A. A hypothesis on cytoplasmic osmoregulation. In: **Regulation of Cell Membrane Activities in Plants** (E Marre, O Cifferi eds), Elsevier, Amsterdam, p.121-136, 1977.

XIONG, L.; ISHITANI, M.; ZHU, J.K. Interaction of osmotic stress, temperature, and abscisic acid in the regulation of gene expression in *Arabidopsis*. **Plant Physiology** v.19, p.205-212, 1999.

XIONG, L.; ZHU, J.K. Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives. **Plant Physiology** v.112, p.152-166, 2001.

XIONG, L.; ZHU, J.-K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant Cell and Environment** v.25, p.131-139, 2002.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K; SHINOZAKI, K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. **Trends in Plant Science** v.10, p. 88-94, 2005.

YANCEY, P.H. Compatible and counteracting solutes. In: **Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation** (K Strange ed), CRC Press, Boca Raton, p.81-109. 1994.

YANCEY, P.H.; CLARK, M.E.; HAND, S.C.; BOWLUS, R.D.; SOMERO, G.N. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. **Science** v.217, p.1214-1222. 1982.

YEN, H.E.; WU, S.M.; HUNG, Y.H.; YEN, S.K. Isolation of 3 salt-induced low-abundance cDNAs from light-grown callus of *Mesembryanthemum crystallinum* by suppression subtractive hybridization. **Physiologia Plantarum** v.110, p.402-409, 2000.

YOSHIBA, Y.; KIYOSUE, T.; KATAGIRI, T.; UEDA, H.; MIZOGUCHI, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; WADA, K.; HARADA, Y.; SHINOZAKI, K. Correlation between the induction of a gene for delta¹-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. **The Plant Journal** v.7, p.751-760, 1995.

YOSHIBA, Y.; KIYOSUE, T.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. **Plant and Cell Physiology** v.38, p.1095-1102, 1997.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews** v.74, p.139-162, 1994.

ZHANG, J.; NGUYEN, H.T.; BLUM, A. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. **Journal of Experimental Botany** v.50, p.291-302, 1999.

ZHU, B.; SU, J.; CHANG, M.C.; VERMA, D.P.S.; FAN, Y.L.; WU, R. Overexpression of a Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt-stress in transgenic rice. **Plant Science** v.139, p.41-48, 1998.

ZHU, J. K., HASEGAWA, P. M., BRESSAN, R. A. Molecular aspects of osmotic stress in plants. **Critical Review of Plant Science** n.16, p.253-277, 1997.

ZHU, J.K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology** v.53, p.247-273, 2002.

3. ARTIGO

Expressão estresse induzida do gene *P5CS* em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) confere tolerância ao déficit hídrico

3.1 Resumo

Título: Expressão estresse induzida do gene *P5CS* em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) confere tolerância ao déficit hídrico

O objetivo deste estudo foi transformar a cana-de-açúcar RB855156 com o gene Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase (*P5CS*) de *Vigna aconitifolia*. Calos embriogênicos provenientes de folhas imaturas foram bombardeados com o plasmídeo pJS107, o qual possui o gene *P5CS* que codifica a enzima Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase, limitante na biossíntese de prolina em plantas, sob controle do promotor estresse induzido AIPC. Para isto, foram analisados 3 eventos de transformação utilizando o gene *bar* como marcador de seleção. As concentrações de prolina, conteúdo de malondialdeído (MDA), clorofila total e o efeito do tratamento do déficit hídrico foram analisados. Em condições de déficit hídrico, os eventos de transformação acumularam prolina até 28,8 $\mu\text{mol g}^{-1}$ de massa foliar seca em comparação com plantas não transformadas. Os níveis de MDA nas plantas controle foram em média 27% maior do que nas plantas transgênicas. Segmentos foliares de cana-de-açúcar transgênicas tratadas com 5 μM de paraquat, um herbicida indutor de estresse oxidativo celular, mostraram níveis de clorofila total em média 80% maior a partir do sexto dia de déficit hídrico comparado com as plantas não transformadas. Mesmo em condição de déficit hídrico severo, o potencial osmótico na folha tanto de plantas transgênicas quanto de plantas controle não se mostrou diferente. Até o sexto dia de estresse hídrico, tanto plantas controle quanto plantas transgênicas não apresentaram alterações significativas nos parâmetros F_0 e F_v/F_m . No nono e décimo segundo dia de estresse hídrico, plantas transgênicas apresentaram rendimento fotoquímico (F_v/F_m) em média 64% e 60% maior, respectivamente. Estes resultados sugerem a participação da prolina na proteção do aparelho fotossintético através de sua habilidade em atuar mais como um removedor de espécies reativas de oxigênio (ROS) do que como um osmoprotetor.

Palavras-chave: *Saccharum* spp., prolina, MDA, fluorescência da clorofila *a*, paraquat, tolerância à seca

3.2 Abstract

Title: Stress induced expression of *P5CS* gene in sugarcane (*Saccharum* spp.) confers tolerance to water deficit

The objective of this study was to transform sugarcane RB855156 with a Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene (*P5CS*) of *Vigna aconitifolia*. Embriogenic callus from immature leaves were bombarded with pJS107 plasmid that contains the *P5CS* gene, which codes for an enzyme Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, under control of a stress-inducible promoter complex AIPC. Therefore, three transformation events were analyzed using the *bar* gene. Free proline contents, malondialdehyde contents (MDA), total chlorophyll contents and the effect of water stress treatment were analyzed. In stressed conditions, the transformation events accumulated proline up to 28.8 $\mu\text{mol g}^{-1}$ leaf dry weight compared with non-transformed plants. The levels of MDA in control plants were 27% higher than in transgenic plants. Leaf segments of transgenic sugarcane treated with 5 μM of paraquat, an inducer of cellular oxidative stress, showed total chlorophyll contents 80% higher since the sixth day after water deficit compared with non-transformed plants. Even in severe water deficit conditions, the leaf osmotic potential of transgenic plants was not different from non-transformed plants. Under six days of water deficit, no significant alteration in *Fo* and *Fv/Fm* was found in both transgenic and control plants. On the ninth and twelfth day of water deficit, transgenic plants presented quantum yield (*Fv/Fm*) 64% and 60% higher, respectively. These results suggest the participation of proline in protection of photosynthetic apparatus more by its ability to act as a free radical scavenger than osmoprotection.

Key words: *Saccharum* spp., proline, MDA, chlorophyll fluorescence, paraquat, drought tolerance

3.3 Introdução

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância econômica no mundo. É cultivada em regiões tropicais e subtropicais de mais de 70 países, sendo o Brasil o maior produtor mundial de açúcar (OIA, 2006). O setor sucroalcooleiro responde por um faturamento anual da ordem de US\$ 7 bilhões (UNICA, 2006). Atualmente, as variedades de cana cultivadas são o resultado do cruzamento interespecífico entre *Saccharum officinarum*, *S. barbieri*, *S. sinense* e as espécies selvagens *S. spontaneum* e *S. robustum*. A cana-de-açúcar apresenta um dos genomas mais complexos do reino vegetal, com um número diplóide de cromossomos que varia entre 70-120 (D'HONT et al., 1996). Esta complexidade dificulta a aplicação de técnicas convencionais de melhoramento genético para a cultura visando o desenvolvimento de novos cultivares com maior produtividade e tolerância a estresses bióticos e abióticos (HOGARTH, 1987). Além disso, muitos materiais altamente promissores são descartados por apresentarem defeitos, como por exemplo, susceptibilidade a alguma doença. Desta forma, tal complexidade e fatores somados tornam a cana-de-açúcar uma excelente candidata ao melhoramento por meio da engenharia genética (ROACH, 1995).

Assim como toda cultura agrícola, a produção da cana-de-açúcar é influenciada por um grande número de fatores ambientais que afetam de maneira negativa seu crescimento, metabolismo e produtividade. Seca, salinidade, baixas e altas temperaturas, inundação, poluentes e radiação são os fatores de estresse mais importantes que limitam a produtividade das culturas (LAWLOR, 2002). No Brasil, dentre estes fatores, o estresse hídrico é o que frequentemente mais influencia de forma negativa a produtividade da cana-de-açúcar. Assim, seus efeitos nas plantas incluem redução nas taxas de assimilação de CO₂, tamanho das células foliares, taxa de transpiração, potencial de água na planta, taxa de crescimento e abertura estomática (HSIAO, 1973; CHAVES et al., 2003). Além disso, o déficit hídrico influencia de maneira direta o crescimento dos perfilhos e a altura final dos colmos e, conseqüentemente, a produção de açúcar (GASCHO; SHIH, 1983, SUGIHARTO, 2004).

O déficit hídrico causa à planta uma série de mudanças fisiológicas, iniciando pelo decréscimo de pressão de turgor da célula (BAJAJ et al., 1999; ZHU, 2002; CHAVES et al., 2003). Também, afeta muitos processos bioquímicos e fisiológicos importantes como ajustamento osmótico, sistema de defesa de enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica.

Muitas plantas respondem ao déficit hídrico por acumular compostos orgânicos não tóxicos de baixo peso molecular, coletivamente conhecidos como solutos ou osmólitos compatíveis, tais como a prolina (RHODES; SÂMARAS, 1994; KISHOR et al., 2005). Plantas submetidas ao déficit hídrico acumulam prolina nas células, o que resulta em decréscimos no potencial osmótico (Ψ_s). Esta redução no Ψ_s favorece a manutenção da absorção de água e da pressão de turgor da célula, contribuindo assim para a manutenção de processos como abertura estomática, fotossíntese e crescimento da planta (ZHANG et al., 1999). A prolina também, está envolvida na proteção de estruturas celulares, e de vários processos metabólicos (RATHINASABAPATHI et al., 2000; KISHOR et al., 2005). Além disso, a prolina pode atuar como um removedor de espécies reativas de oxigênio (ROS) (BOWLER et al., 1992; TSUGANE et al., 1999). Desta forma, o aumento da síntese de prolina em plantas pode auxiliar na tolerância ao estresse oxidativo.

Em plantas, a prolina é sintetizada a partir de glutamato e ornitina (HU et al., 1992; KISHOR et al., 2005). A via glutamato é predominante em plantas em condições de estresse osmótico e falta de nitrogênio (DELAUNEY et al., 1993). O glutamato é convertido para glutamato semi-aldeído por uma única enzima bifuncional, Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS), o qual é ciclado espontaneamente para pirrolina-5-carboxilato, que é então reduzido a prolina pela enzima pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR).

O aumento da tolerância ao déficit hídrico pela transformação genética já foi obtido em várias espécies utilizando-se duas estratégias: introdução de genes envolvidos na síntese de moléculas osmoprotetoras ou através de genes codificando fatores de transcrição (RIBAUT et al., 2002).

Dentro do grupo de moléculas osmoprotetoras, inúmeros trabalhos mostram a capacidade da prolina em aumentar a tolerância de plantas a estresses abióticos como, por exemplo, a seca e o estresse salino (KISHOR et al., 1995; ZHU

et al, 1997; HONG et al., 2000; NANJO et al., 1999; SAWAHEL & HASSAN, 2002; MOLINARI et al., 2004; DE RONDE et al., 2004; HMIDA-SAYARI et al., 2005).

Assim, a obtenção de variedades de cana-de-açúcar com maior acúmulo de prolina representa uma estratégia promissora para aumentar a tolerância a estresses, principalmente o estresse hídrico, além de proporcionar valioso material tanto para estudos sobre mecanismos de tolerância a estresses abióticos como para utilização direta em sistemas produtivos.

3.4 Material e Métodos

3.4.1 Material Vegetal

Plantas de cana-de-açúcar, variedade RB855156, com 6 a 8 meses de cultivo foram utilizadas para os estudos. Esta variedade é o resultado do cruzamento RB72454 x TUC71-7. Trata-se de uma variedade precoce, rica e altamente produtiva. Em ensaios preliminares apresentou grande produção de calos embriogênicos *in vitro*.

3.4.2 Cultura de tecidos e transformação genética

Folhas imaturas (cilindro de aproximadamente 2 x 10 cm) foram desinfestadas superficialmente por 1 min com EtOH 70% (v/v), seguido de incubação por 20 min com uma solução de 2,5% (v/v) de hipoclorito de sódio e enxaguadas cinco vezes com água destilada esterilizada. Segmentos transversais da região meristemática foram então removidos e cortados transversalmente em segmentos de 2-3 mm, os quais foram usados para os experimentos de transformação (BOWER et al., 1996). Os explantes foram colocados em frascos Magenta™ com meio de indução contendo micro e macronutrientes do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 20 g l⁻¹ de sacarose, 280 mM arginina, 13 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e solidificado com 8 g l⁻¹ de Bacto Agar. As culturas foram mantidas no escuro a 27±1 °C por 4 semanas. Os calos embriogênicos que surgiram nos explantes foram individualizados e transferidos para meio de indução, anteriormente citado. Foram realizados de 3 a 5 sub-cultivos em intervalos de 15 dias para promover o rápido crescimento dos calos embriogênicos e, também, facilitar a eliminação dos calos não embriogênicos.

Para transformação, calos embriogênicos (4-8 mm) foram mantidos em meio de cultura quatro horas antes e depois do bombardeamento de partículas (VAIN et al., 1993).

A suspensão de micropartículas foi preparada de acordo com metodologia de Sanford et al. (1993) usando 25 µl de suspensão de partículas (60 mg ml⁻¹), 2,5 µl do plasmídeo pJS107 (0,5 mg µl⁻¹), 25 µl CaCl₂ (2,5 M) e 10 µl de

espermidina (0,1 M). Cinco microlitros da suspensão de micropartículas foram pipetadas em membrana carreadora e secas em suporte contendo sílica gel em câmara de fluxo laminar. Partículas de tungstênio M17 (Biorad, $\sim 1.1 \mu\text{M}$) foram usadas para os experimentos. O equipamento de bombardeamento PDS-1000/He (Biorad) foi usado com pressão de vácuo de 27" Hg, 10 mm de distância do disco de ruptura e 10 mm da membrana carreadora. A pressão de ruptura de disco usada e distância da prateleira (distância percorrida pela micropartícula até atingir o explante) foram de 1200 psi e 90 mm, respectivamente.

Após o bombardeamento, os calos foram selecionados em meio de cultura contendo 25 μM de glufosinato de amônio. As plantas transformadas foram regeneradas e enraizadas pela transferência dos calos embriogênicos para meio sem a adição de 2,4-D. As culturas foram mantidas a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ sob fotoperíodo de 16 horas luz e intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Plantas enraizadas *in vitro* foram transplantadas para isopor em substrato comercial (PlantmaxTM) acrescido de matéria orgânica e vermiculita.

3.4.3 Plasmídeo pJS107

O plasmídeo vetor pJS107 (SU et al., 1998), usado para transformação da cana-de-açúcar, contém o gene marcador de seleção *bar* que codifica para a enzima fosfinotricina acetil transferase (confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio) sob o controle do promotor constitutivo CaMV 35S e o gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia*, sob controle do complexo promotor estresse induzido designado como AIPC (ABA inducible promoter complex). O promotor AIPC contém um elemento ABA responsivo (ABRC1) de 49 pb do gene *HVA22* de cevada (SHEN & HO, 1995), uma versão mínima de 180 pb da região promotora do gene Actina 1 (pAct1-100) de arroz e a seqüência intron de 233 pb do gene *HVA22* (FIGURA 1).

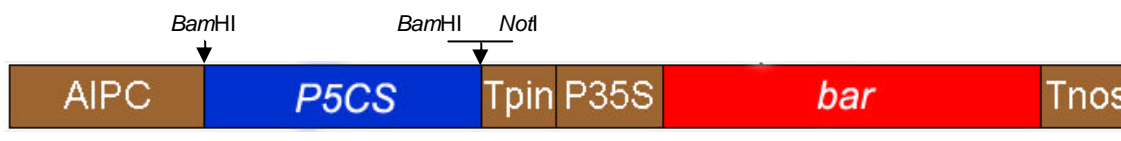


FIGURA 1. Diagrama do plasmídeo pJS107 utilizado nos experimentos de transformação de cana-de-açúcar. Barra em negrito corresponde à sonda usada para análises de DNA e RNA.

3.4.4 Análises da integração do transgene

A análise das plantas transformadas foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar a presença do transgene *bar* em plântulas “*in vitro*”. DNA genômico foi extraído através de protocolo baseado em Doyle & Doyle (1987). Cada reação (20 µl) continha 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 100 µM de cada dNTP, 1,0 U de *Taq* polimerase, 50 ng de DNA e 5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador específico para o gene *bar*. Os oligonucleotídeos iniciadores 5'-GTCTGCACCATCGTCAACC-3' e 5'-GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC-3' foram utilizados para a amplificação de um fragmento de 450 pb. As reações foram submetidas ao seguinte programa de temperaturas: 5 min a 94 °C, seguido de 40 ciclos de amplificação (1 min a 94 °C; 1 min 59 °C; 1 min a 72 °C) e extensão final de 5 min a 72 °C, em termociclador PTC-100™ (MJ Research, Waltham, MA, U.S.A.). Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em tampão SB 1X (BRODY; KERN, 2004) em gel de agarose 1,5% (p/v) e visualizados após coloração com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) sob luz UV.

Análises de Southern blot foram feitas para confirmar a integração do transgene *P5CS* nas plantas transgênicas de cana-de-açúcar. O DNA genômico foi isolado de folhas inteiramente expandidas de acordo com metodologia de Doyle & Doyle (1987). Vinte µg de DNA de cada amostra foram incubadas com as enzimas *NotI* e *BamHI* a 37 °C por 16 h e submetidas à eletroforese em tampão SB 1X em gel de agarose 0,8% (p/v) a 2 V/cm por 16 h. Após a eletroforese, foi feita a transferência do DNA à membrana de Nylon (Hybond-N⁺, Amershan Pharmacia

Biotech, PI, EUA) e fixado mediante incubação a 80 °C por 2h, conforme descrito por Sambrook et al. (1989). Sequência de aproximadamente 2,4 Kb, correspondente ao gene completo *P5CS*, foi utilizado como sonda para hibridização. Esta sonda foi obtida através da digestão do plasmídeo pJS107 com *Bam*HI, sendo a marcação feita utilizando $\alpha^{32}\text{P}$ d-CTP pela técnica de “random priming”. Após hibridização e lavagens a 42 °C, as membranas foram expostas a filme de Raio-X a -70 °C.

Plantas que apresentaram amplificação para o gene *bar*, juntamente com plantas controle (não transformadas) foram usadas para o ensaio de resistência ao herbicida glufosinato de amônio. Plantas foram pulverizadas duas vezes com o herbicida glufosinato de amônio a 2%. As plantas foram avaliadas 8 dias após a pulverização.

3.4.5 Análise da expressão do transgene

Para as análises de Northern blot, RNA total foi extraído de folhas inteiramente expandidas de cana-de-açúcar utilizando TRIzol (Invitrogen). Dez µg de RNA total de plantas transgênicas e não transgênicas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose desnaturante (1,0% de formaldeído). Após a eletroforese, o RNA foi transferido para uma membrana de Nylon (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech, PI, EUA) e fixado mediante incubação a 80 °C por 2h, conforme descrito por Sambrook et al. (1989). Sequência de aproximadamente 2,4 Kb correspondente ao gene completo *P5CS* foi utilizado como sonda para hibridização. A marcação da sonda foi feita utilizando $\alpha^{32}\text{P}$ d-CTP pela técnica de “random priming”. Após hibridização e lavagens a 42 °C, as membranas foram expostas a filme de Raio-X a -70 °C.

3.4.6 Análise da tolerância ao déficit hídrico

Cinco plantas de cada um dos eventos 4, 7 e 10 de cana-de-açúcar e do controle, clonadas por micropropagação, foram submetidas a um período de 12 dias sem adição de água em vasos com 17 Kg de substrato (3 terra: 1 areia). Para

minimizar a variabilidade, todas as plantas tinham idade e tamanho similar (2 meses e cerca de 100 cm de altura).

Os vasos foram dispostos em posições semelhantes em relação à incidência de radiação solar. As coletas de dados foram feitas a cada três dias, a partir do início do déficit hídrico. O monitoramento da umidade no substrato dos vasos foi feito durante os 12 dias de estresse hídrico com o auxílio de sondas TDR (Time Domain Reflectometry) acopladas ao aparelho Tektronix 1502B Metallic TDR Cable Tester (Tektronix). Os valores obtidos nas leituras foram multiplicados por um fator para estimativa da umidade do solo. Para isso, utilizou-se a equação de calibração para a constante dielétrica (Ka) proposta por Topp (1980):

$$q \text{ (m}^3 \text{ m}^{-3}\text{)} = (-5,3 \times 10^{-2}) + (2,92 \times 10^{-2} \text{ Ka}) - (5,5 \times 10^{-4} \times \text{Ka}^2) + (4,3 \times 10^{-6} \times \text{Ka}^3)$$

A constante dielétrica (Ka) é obtida em função do comprimento da haste (L; m), que é corrigida pela velocidade de propagação do pulso elétrico (VP = 0,66). É usado o fator 1000 para transformar os dados das leituras na unidade métrica (m), considerando-se o comprimento das hastes metálicas das sondas de 220 mm, sendo $L = \text{leitura}/0,66$ e $\text{Ka} = (L/1000/0,22)^2$.

O estado da água nas folhas foi monitorado através de psicrômetros de termopar (modelo C-30, Wescor, Inc., Logan, Ut, U.S.A.) acoplados a um datalogger (Campbell Scientific, Inc., Logan, Ut, U.S.A., modelo CR-7). A cada dia de leitura, entre 9h30 e 10h, uma amostra de aproximadamente 2 cm² da folha + 1 de cada planta foi coletada e colocada nos psicrômetros. O datalogger foi programado para que as leituras fossem efetuadas a cada 10 min até que o equilíbrio da pressão de vapor na câmara fosse verificado. A microvoltagem fornecida pelo sistema foi convertida em potencial da água (MPa) em função de prévia calibração dos sensores com soluções de cloreto de sódio. Após a obtenção do potencial total da água (Ψ_t), os sensores foram imersos durante 4 min em nitrogênio líquido e as leituras foram retomadas para obtenção do potencial osmótico (Ψ_s). O cálculo do potencial de pressão foi realizado através de $\Psi_t - \Psi_s$.

Logo após a coleta do material, as taxas de fotossíntese líquida ($\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) em cada planta foram obtidas utilizando um sistema portátil de fotossíntese, modelo LI-6200 (LI-COR), Lincoln, NE, EUA), com câmara de 1 litro. As medidas foram feitas em condições naturais, em folhas +1 da planta. As plantas estressadas, após terem atingido um valor de assimilação de CO_2 próximo de zero, foram irrigadas novamente.

3.4.7 Medidas da fluorescência da clorofila *a*

A emissão de fluorescência inicial, máxima e variável, e a estimativa da capacidade fotoquímica do fotossistema II (dado pela razão entre fluorescência variável e fluorescência máxima) foram determinadas por um fluorômetro portátil "Plant Efficiency Analyser", PEA (Hansatech Instruments). As medidas foram feitas após pré-condicionamento no escuro, por uma hora, para garantir o estado oxidado dos centros de reação fotossintéticos. Todas as medições foram feitas em folhas +1.

3.4.8 Determinação da quantidade de prolina

A determinação da concentração de prolina nas folhas foi feita baseada em curva-padrão, conforme descrito por Bates (1973). Resumidamente, em condições normais e de estresse hídrico, folhas de cada uma das cinco plantas transgênicas de cada evento e das plantas controle foram utilizadas para a análise de prolina. Como a concentração deste aminoácido varia conforme o estágio de desenvolvimento das folhas, padronizou-se o uso de folhas de mesma idade e tamanho. Foram coletados 100 mg de tecido, rapidamente congelado e macerado em N_2 líquido. A extração foi feita com adição de ácido sulfosalicílico (10%) e, em seguida, o extrato foi centrifugado (10.000 rpm) por 5 min. Foram coletados 2 ml do centrifugado e acrescentados 2 ml da solução de ácido nítrico (1,25 g de nítrina; 30 ml de ácido acético glacial; 20 ml de ácido fosfórico 6M) e de 2 ml de ácido acético glacial em tubos de microcentrífuga de 15 ml. As amostras foram então incubadas a 100 °C por 1 h e, em seguida, transferidas para gelo. Após incubação, as amostras foram acrescidas de 4 ml de tolueno e homogeneizadas por 20 s para

completa extração da prolina. O sobrenadante foi utilizado para determinação da concentração de prolina por espectrofotometria (520 nm).

3.4.9 Determinação do conteúdo de malondialdeído (MDA)

Em condições normais e de estresse hídrico, folhas de cada um dos eventos transgênicos e de plantas controle foram utilizadas para a análise do conteúdo de MDA segundo metodologia de Hodges et al. (1999). Tecidos foliares (sem a nervura central) foram pulverizados em almofariz e homogeneizados em solução 80:20 (v/v) etanol:água, seguido de centrifugação a 3000 g por 10 min. Um mililitro do extrato foi colocado em um tubo de microcentrífuga de 15 ml e misturado a mais um mililitro dos reagentes: a. solução –TBA (20% (p/v) de ácido tricloroacético), b. solução +TBA (20% (p/v) de ácido tricloroacético e 0,65% (p/v) de TBA (ácido tiobarbitúrico)). As amostras foram então misturadas vigorosamente e incubadas a 100 °C por 25 min, em seguida, transferidas para gelo e centrifugadas a 3000 g por 10 min. As absorbâncias foram lidas nos comprimentos de onda 440 nm, 532 nm e 600 nm. Equivalentes de malondialdeído foram calculados da seguinte maneira:

$$1) [(Abs\ 532_{+TBA}) - (Abs\ 600_{+TBA}) - (Abs\ 532_{-TBA} - Abs\ 600_{-TBA})] = A$$

$$2) [(Abs\ 440_{+TBA} - Abs\ 600_{+TBA}) \cdot 0.0571] = B$$

$$3) \text{Equivalentes de MDA (nmol ml}^{-1}\text{)} = (A - B / 157\ 000) \cdot 10^6$$

3.4.10 Determinação do conteúdo de clorofila total e testes de estresse oxidativo

Os testes de estresse oxidativo em plantas de cana-de-açúcar foram feitos de acordo com Moon et al. (2003). Folhas recém coletadas tanto de plantas transgênicas quanto de não transgênicas, submetidas a déficit de água gradativo de 12 dias, foram coletadas e incubadas em placas de Petri (3 segmentos com $\sim 1\text{ cm}^2$ de área) em solução de água destilada contendo 5 μM de paraquat por 24h de luz e intensidade luminosa de 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. Segmentos foliares de cana-de-açúcar não tratados com paraquat foram usados como controle negativo.

O conteúdo de clorofila total foi determinado segundo metodologia de Lichtenthaler (1987). A extração da clorofila foi feita em acetona 80% e a quantificação por espectrofotometria em 663 e 645 nm. Os cálculos de mg de clorofila por grama de peso fresco de tecido foliar basearam-se nas equações:

$$1) \text{ Clorofila a } (\mu\text{g ml}^{-1}) = 12,7 (\text{Abs}_{663}) - 2,69 (\text{Abs}_{645})$$

$$2) \text{ Clorofila b } (\mu\text{g ml}^{-1}) = 22,9 (\text{Abs}_{645}) - 4,68 (\text{Abs}_{663})$$

$$3) \text{ Clorofila total } (\mu\text{g ml}^{-1}) = 20,2 (\text{Abs}_{645}) + 8,02 (\text{Abs}_{663})$$

3.4.11 Determinação da massa seca total de parte aérea e raiz

Para determinação da massa seca total tanto de parte aérea quanto de raiz foram utilizadas cinco plantas de cada tratamento (controle, evento 4, evento 7 e evento 10 de cana-de-açúcar transgênica). O material foi seco em estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 80 °C, até atingirem massa constante.

3.4.12 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos inteiramente casualizados com 5 repetições sendo que cada repetição consistiu de um clone de cada evento e da planta controle. Os tratamentos utilizados foram dispostos em esquema fatorial 4 x 4, para plantas e épocas de submissão ao déficit hídrico. Foram considerados como tratamento testemunha as plantas não transformadas que passaram por protocolo de cultura de tecidos. Foi realizada a análise de variância dos dados pelo teste F. A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa SAS, sendo a comparação entre médias efetuada pelo teste de Tukey (P = 0,05).

3.5 Resultados

3.5.1 Transformação genética

O esquema de obtenção de explantes, transformação e regeneração, a partir de segmentos transversais (2-3 mm) de folhas imaturas de cana-de-açúcar de material proveniente de campo, pode ser observado na FIGURA

2. Para este estudo foram obtidas eficiências de transformação de 1,7%, usando a variedade de cana-de-açúcar RB855156 (TABELA 1). A eficiência de transformação foi calculada pela fórmula: $(\text{n}^\circ \text{ de plantas } bar \text{ positivas enraizadas} / \text{n}^\circ \text{ de placas bombardeadas} \times \text{quantidade de calos por placa}) \times 100$. Nenhuma diferença morfológica aparente foi observada nas plantas transgênicas quando comparadas a plantas não transgênicas 2 meses após a transferência das plantas para a casa-de-vegetação.

TABELA 1. Eficiência de transformação via biobalística com a variedade de cana-de-açúcar RB855156

Variedade	Nº de placas bombardeadas	Quantidade de calos por placa	Nº de calos <i>bar</i> positivos regenerados	Nº de plantas <i>bar</i> positivas enraizadas
RB 855156	40	25	6	17

Os eventos com maiores concentrações de prolina nas folhas foram selecionados após submissão das plantas transgênicas a 9 dias de estresse. Enquanto plantas controle apresentavam concentrações que variaram de 3,42 a 4,87 $\mu\text{moles de prolina g}^{-1}$ de peso fresco, as plantas transgênicas selecionadas de cana-de-açúcar variedade RB855156 variaram de 15,82 a 28,8 $\mu\text{moles de prolina g}^{-1}$ de peso fresco (Dados não apresentados). Os melhores eventos quanto ao acúmulo estresse induzido de prolina foram os eventos 4, 7 e 10, todos com cerca de 2-2,5 vezes mais prolina em relação às plantas controle (não transformadas).

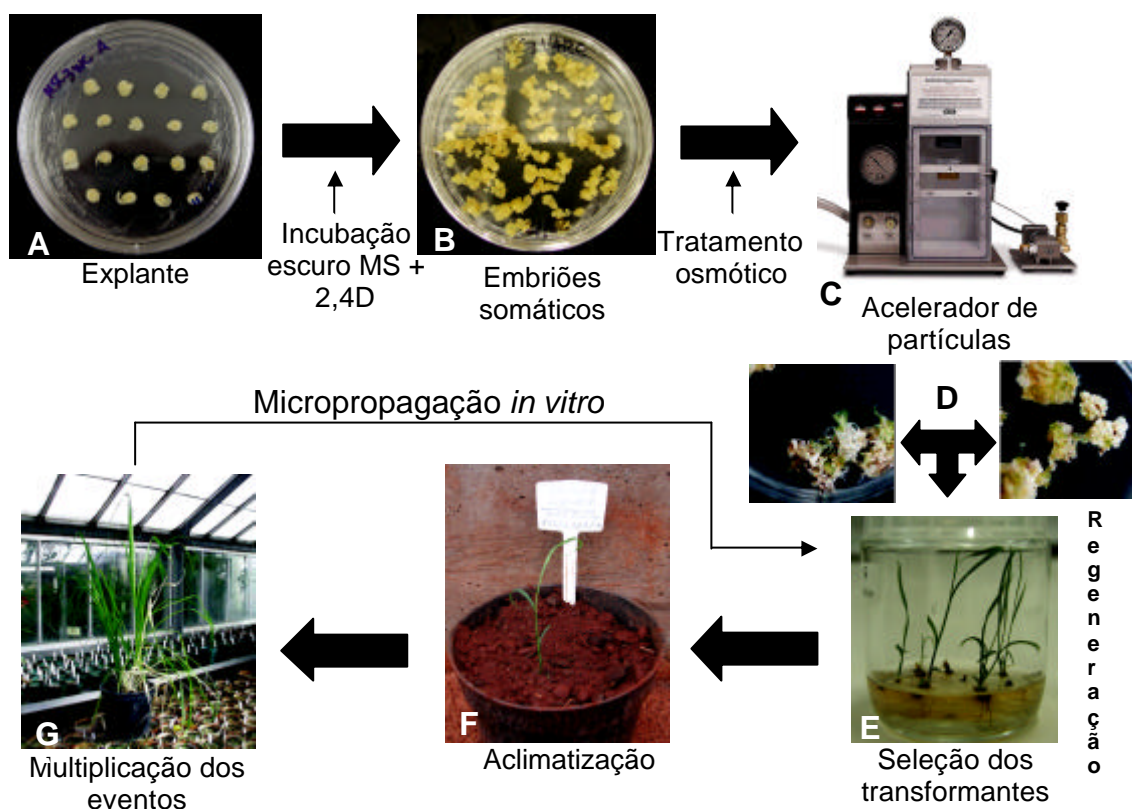


FIGURA 2. Esquema de regeneração e transformação de cana-de-açúcar. A – Explantes de folhas imaturas com 2-3 mm; B – Calos embriogênicos obtidos após 4 subcultivos em meio MS acrescido de $13 \mu\text{M}$ de 2,4-D; C – Aparelho de bombardeamento PDS-1000/He usado nos experimentos de transformação genética da cana-de-açúcar; D – Etapa de regeneração dos calos embriogênicos em meio de cultura contendo $25 \mu\text{M}$ de glufosinato de amônio; E – Alongamento e enraizamento das plantas putativas transgênicas de cana-de-açúcar; F – Fase de aclimatização das plantas em casa-de-vegetação; G – Fase de multiplicação dos eventos.

3.5.2 Análises moleculares

A inserção do transgene *bar* no genoma da variedade de cana RB855156 foi detectado por meio de PCR (reação em cadeia da polimerase). Das 26 plantas obtidas pelo processo de transformação biolística, 17 mostraram o fragmento esperado de 450 pb (FIGURA 3). Como esperado, plantas não transgênicas que passaram pelo mesmo protocolo de regeneração não apresentaram o fragmento.



FIGURA 3. Análises de PCR de cana-de-açúcar variedade RB 855156. Linha M – Marcador de peso molecular (Ladder 100 pb); linhas 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 18 – plantas transgênicas; linhas 3, 5, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 19 – escapes; linha C – controle negativo de cana-de-açúcar variedade RB855156 (planta não transformada); P – controle positivo (plasmídeo pJS107).

Para determinar o número de cópias que foram inseridos no genoma da variedade de cana RB855156, foram feitos Southern blots de 4 plantas selecionadas que se mostraram positivas para o PCR com o gene *bar* e que apresentaram maior conteúdo de prolina nas folhas em testes preliminares. DNA total obtido de folhas foram digeridos primeiramente com a enzima de restrição *NotI* que possui um único sítio no T-DNA e posteriormente com a enzima de restrição *BamHI*. Ambas digestões foram hibridizadas com sonda de ~2,4 kb referente ao gene completo *P5CS* de *Vigna aconitifolia*. Todas as plantas analisadas mostraram a integração do transgene em seu genoma (FIGURA 4). Somente o evento 10 apresentou uma única cópia do transgene. Os eventos independentes 4 e 7 apresentaram duas cópias do transgene, enquanto que o evento 6 apresentou

quatro cópias do transgene em seu genoma. Para verificar a possibilidade de múltiplas cópias no mesmo sítio de inserção do transgene, procedeu-se à digestão das amostras com a enzima de restrição *Bam*HI, que libera o gene *P5CS* não mutante de *Vigna aconitifolia* do vetor pJS107. Assim, foi possível correlacionar a variação entre as bandas em relação à intensidade do sinal de hibridização e o número de cópias (FIGURA 4).

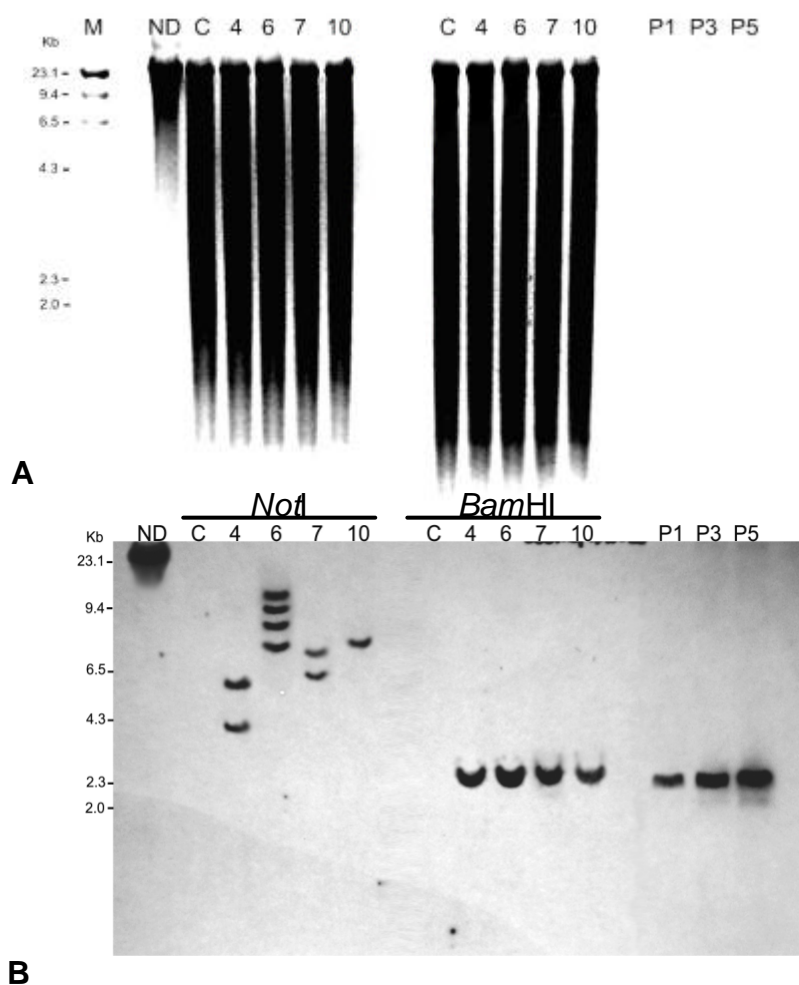


FIGURA 4. Análise de Southern blot em cana-de-açúcar. A – Gel de agarose com amostras digeridas com as enzimas *NotI* e *Bam*HI. B – Southern dos eventos selecionados. Linha ND – DNA de plantas transgênicas não digerido; Linha C – controle negativo de cana-de-açúcar variedade RB855156 (planta não transformada); Linhas 4, 6, 7 e 10 – plantas transgênicas de cana-de-açúcar variedade RB855156; P1, P3 e P5 – plasmídeo digerido correspondente a 1, 3 e 5 cópias do transgene.

3.5.3 Caracterização do conteúdo de água no substrato

Na primeira avaliação o conteúdo de água (θ) nos vasos variou de 0,26 a 0,30 $\text{m}^3 \text{m}^{-3}$ para os quatro tratamentos (TABELA 2). Esta avaliação foi realizada após o início da drenagem do solo saturado. Os valores do conteúdo de água aproximaram-se da capacidade de campo correspondente ao potencial mátrico ($\psi = -0,008 \text{ MPa}$), considerando-se a porosidade total de 0,36 $\text{m}^3 \text{m}^{-3}$.

Do segundo ao quinto dia de avaliação houve progressiva redução do conteúdo de água nos vasos sem que houvesse diferenciação estatística entre os quatro tratamentos (TABELA 2). No quinto dia de avaliação, o conteúdo de água nos vasos variaram de 0,09-0,11 $\text{m}^3 \text{m}^{-3}$, valores que corresponderam ao ponto de murcha permanente ($\psi = -1,5 \text{ MPa}$).

Nas avaliações subseqüentes, sexto, oitavo, nono e décimo primeiro dia de avaliação foram constatados os menores valores do conteúdo de água (0,06-0,10 $\text{m}^3 \text{m}^{-3}$), tendo sido constatada a diferenciação estatística (Tukey; $p < 0,05$) entre os tratamentos (TABELA 2). De um modo geral, os vasos dos tratamentos Controle e T7 continham maiores conteúdo de água do que os tratamentos T4 e T10.

O monitoramento temporal do conteúdo de água nos vasos apresentados na Tabela 2, permitiu a caracterização do consumo diferenciado de água pelas plantas de cana-de-açúcar, entre os potenciais mátricos da capacidade de campo e ponto de murcha permanente, descrevendo o consumo e a drenagem da água do solo desde a saturação até a água residual retida pelos microporos (TABELA 2).

TABELA 2. Conteúdo de água (θ ; $\text{m}^3 \text{m}^{-3}$) para os quatro tratamentos no período de 12 dias de déficit hídrico.

Tratamento	0	2	6	8	9	12
	dia					
Controle	0,2998 a	0,2619 a	0,1038 a	0,0898 a	0,0838 a	0,0823 a
T4	0,2635 a	0,2094 a	0,0723 b	0,0635 b	0,0579 c	0,0579 b
T7	0,2983 a	0,2433 a	0,0886 ab	0,0780 ab	0,0764 ab	0,0764 a
T10	0,2869 a	0,2366 a	0,0793 ab	0,0706 b	0,0677 bc	0,0677 ab
CV(%)	8,2048	12,8958	18,0724	13,0387	11,8348	12,1281

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre os tratamentos (coluna) (Tukey; $p < 0,05$)

Ao se proceder ao cálculo do consumo de água (%) pelas plantas de cana-de-açúcar nos vasos verificou-se que até o quinto dia de avaliação este foi maior nos tratamentos T4 e T10 do que nos tratamentos Controle e T7 (FIGURA 5). No sexto e oitavo dia de avaliação, observou-se aumento e manutenção de maior consumo de água (%), respectivamente, para os tratamentos Controle e T4 em relação aos demais tratamentos (FIGURA 5). O tratamento T4, portanto, apresentou o menor conteúdo de água e o maior consumo de água (%) pelas plantas de cana-de-açúcar (TABELA 2 e FIGURA 5), caracterizando o tratamento de maior ineficiência nas relações solo-planta e na utilização da água do solo. Diferentemente, os tratamentos T7 e T10 consistiram de plantas de cana-de-açúcar que minimizaram o consumo relativo de água do solo sob condição de estresse hídrico.

Os valores de θ estão caracterizando que houve decréscimo acentuado do conteúdo de água nos vasos durante os primeiros seis dias de déficit hídrico, devido a saturação do solo acima da capacidade de campo ($0,26-0,30 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$) imposta para iniciar as avaliações.

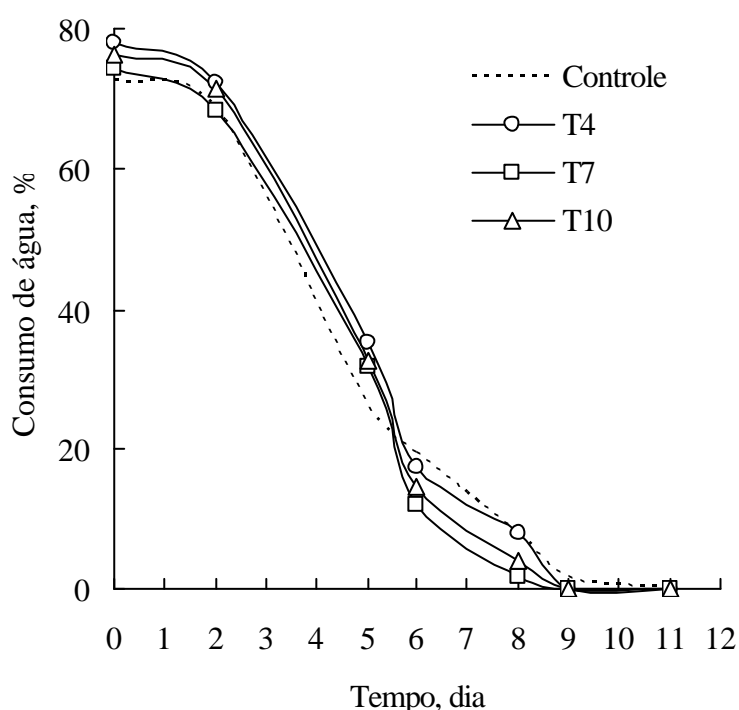


FIGURA 5. Consumo de água relativo ao tempo inicial (Zero).

3.5.4 Ensaios de tolerância ao déficit hídrico

Em condições normais de suprimento de água, o potencial total da água e a fotossíntese líquida não foram diferentes entre as plantas controle e transgênicas (FIGURAS 6A e 7, respectivamente).

Sob condições de estresse, o potencial da água e osmótico nas plantas controle e transgênicas foram muito semelhantes até o fim do período estudado (FIGURAS 6A e B). O potencial de pressão nas plantas transformadas manteve-se ainda positivo até o nono dia de estresse para os eventos T4 e T10, porém ao décimo segundo todas as plantas apresentavam potencial de pressão negativo, indicando que as plantas estavam com seu metabolismo comprometido (FIGURA 6C).

As taxas fotossintéticas das plantas transgênicas foram maiores, porém não estatisticamente significativas durante o período de estresse hídrico (FIGURA 7). No décimo segundo dia, apesar dos baixos valores de fotossíntese apresentados pelas plantas transgênicas, estas ainda apresentavam-se verdes.

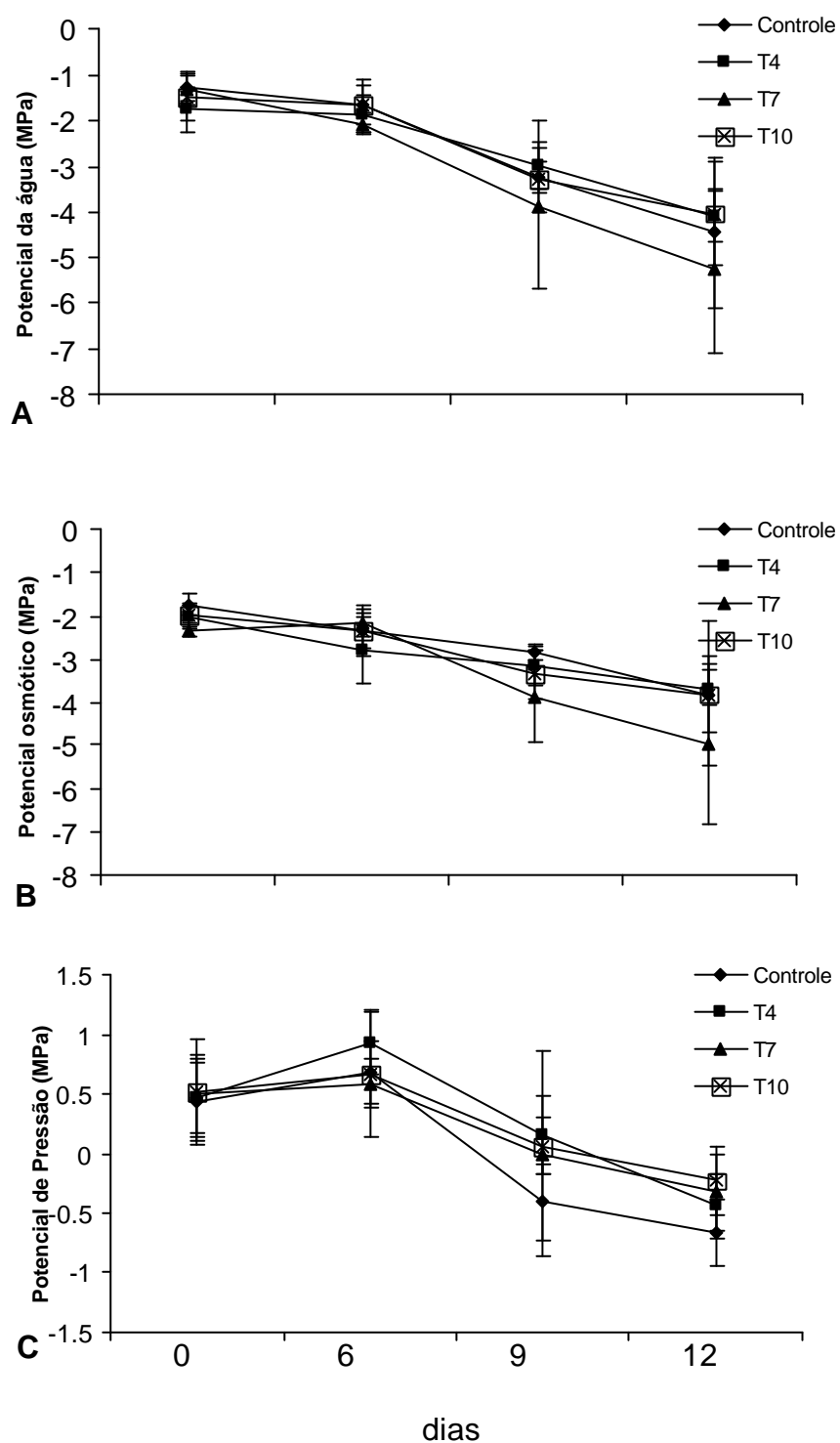


FIGURA 6. A - Potencial total da água; B – Potencial osmótico; C – Potencial de pressão nas folhas nos eventos transgênicos de cana-de-açúcar submetidos a 12 dias de estresse hídrico. Potenciais expressos em mega pascal (MPa). Valores são apresentados como média \pm erro padrão ($n = 5$) (Tukey; $p < 0,05$). Coeficientes de variação = 32,9, 27,3 e 25,2%, A, B e C respectivamente.

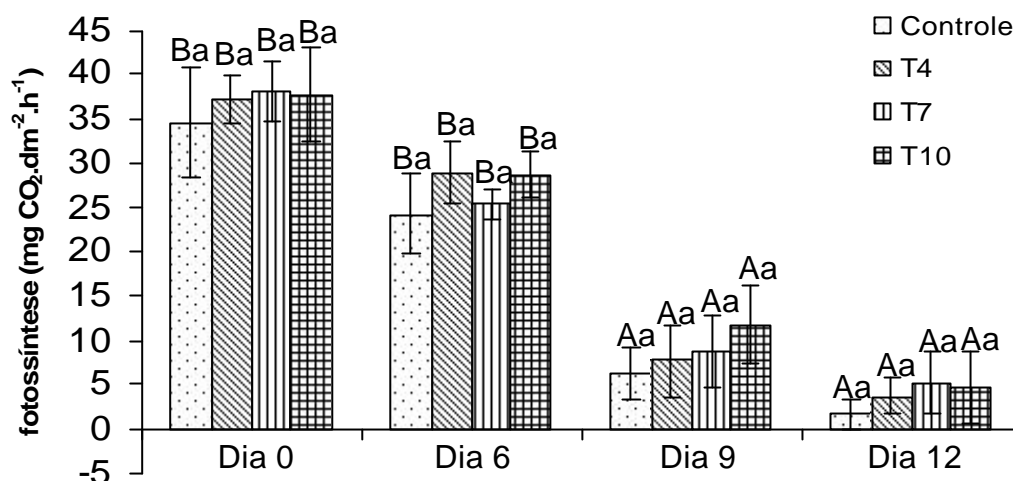


FIGURA 7. Taxa de fotossíntese líquida expressa em $\text{mg CO}_2.\text{dm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ nos eventos transgênicos de cana-de-açúcar após 12 dias sem irrigação. Valores são apresentados como média \pm erro padrão ($n = 5$) (Tukey; $p < 0,05$). Coeficiente de variação = 20,09%.

Para análise da tolerância de plantas transgênicas ao déficit hídrico foram utilizados os eventos 4, 7 e 10. Estes eventos foram escolhidos com base na concentração de prolina obtida em experimentos preliminares (Dados não mostrados). Em condições normais de suprimento de água, não houve diferença na concentração de prolina nas folhas destes eventos. Entretanto, no sexto dia de déficit hídrico a concentração de prolina aumentou significativamente tanto nas plantas não transformadas quanto nas transgênicas. Neste dia, os eventos transgênicos apresentaram cerca de duas vezes mais prolina quando comparadas com as plantas controle (FIGURA 8). No nono dia de estresse, não houve alteração na concentração de prolina nas plantas controle. Por outro lado, plantas transgênicas de todos os eventos apresentaram em média cerca de 2,5 vezes mais prolina nas folhas (FIGURA 8), sendo que a concentração se manteve praticamente constante até o final do experimento.

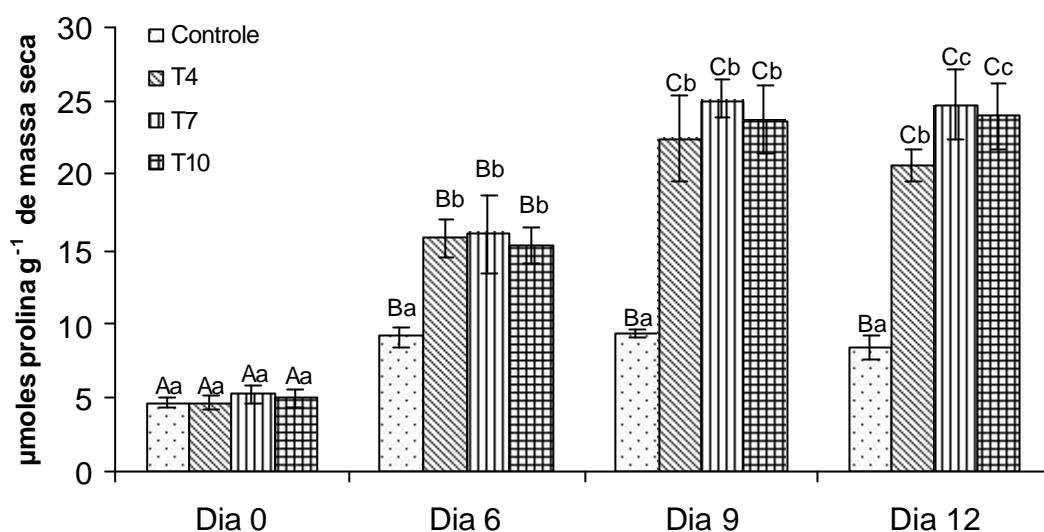


FIGURA 8. Concentração de prolina em plantas controle e transgênicas submetidas a 12 dias de estresse hídrico. Valores são apresentados como média \pm erro padrão ($n = 5$). Letras maiúsculas comparam colunas de mesmo padrão; letras minúsculas comparam colunas de padrões diferentes. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Coeficiente de variação = 10,7%.

3.5.5 Análise da expressão do transgene

Como o conteúdo de prolina nos diferentes eventos se mostrou similar ao longo do déficit hídrico, independente do número de cópias do gene heterólogo *P5CS* inserido, procedeu-se análises do padrão de expressão do transgene em plantas estressadas e não estressadas no evento 10 de cana-de-açúcar. Plantas transgênicas submetidas a 0, 6, 9 e 12 dias de estresse hídrico apresentaram aumento no número de transcritos a partir sexto dia de estresse, acentuando a expressão no último dia (12 dias sem irrigação). Plantas não transformadas tanto em condições normais de suprimento de água, quanto em condições de estresse hídrico não mostraram expressão do transgene (FIGURA 9).

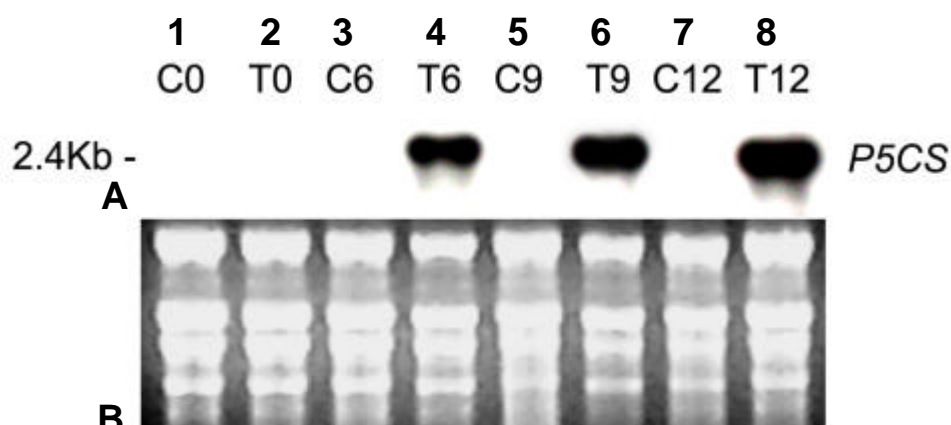


FIGURA 9. Análise da expressão de *P5CS* por Northern blot em cana-de-açúcar. Linhas 1, 3, 5, 7 – plantas controle de cana-de-açúcar variedade RB855156 submetidas a 0, 6, 9 e 12 dias de déficit hídrico, respectivamente. Linhas 2, 4, 6, 8 – plantas transgênicas (evento 10) de cana-de-açúcar variedade RB855156, submetidas 0, 6, 9 e 12 dias sem irrigação; B – Controle de loading de RNA total das amostras.

3.5.6 Teores de MDA

Os teores de MDA, um produto da peroxidação de lipídeos, aumentaram significativamente durante a imposição do estresse (FIGURA 10). Todos os eventos transgênicos apresentaram menores níveis de acúmulo de MDA, quando comparadas com as plantas controle, à medida que o estresse aumentava. A partir do nono dia de estresse hídrico os níveis de MDA nas plantas controle foram em média 27% maior do que nas plantas transgênicas (FIGURA 10).

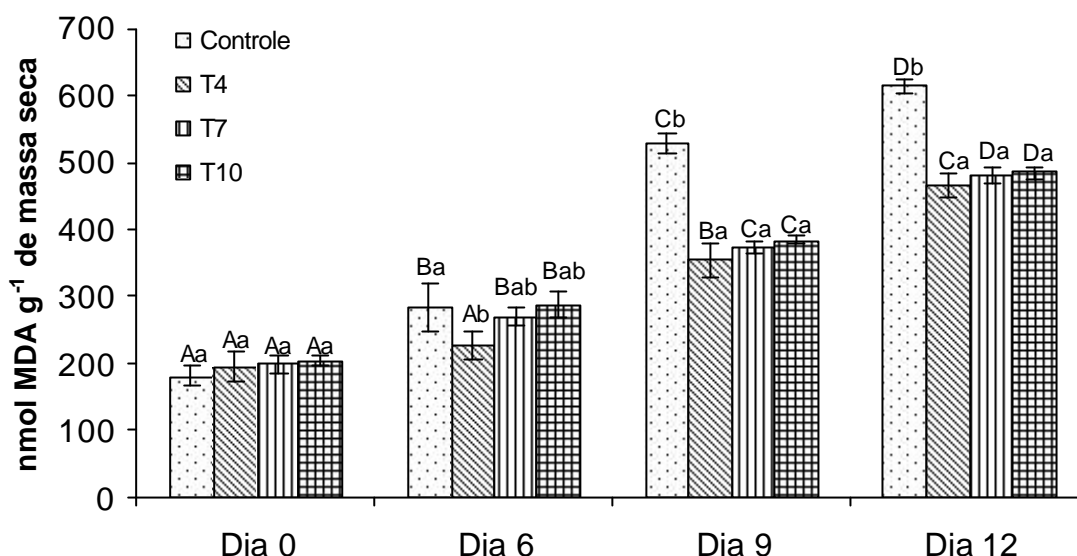


FIGURA 10. Nível de peroxidação de lipídeos (teor de MDA) em folhas de plantas de cana-de-açúcar. Valores são apresentados como média \pm erro padrão ($n = 5$). Letras maiúsculas comparam colunas de mesmo padrão; letras minúsculas comparam colunas de padrões diferentes. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Coeficiente de variação = 5,09%.

3.5.7 Tratamento com herbicida paraquat

Os resultados do tratamento com 5 μ M de paraquat mostraram um evidente branqueamento dos segmentos de plantas controle após 24h (FIGURA 11A), enquanto nas plantas transgênicas estes se apresentaram verdes (FIGURAS 11B, D e E). Os segmentos foliares de cana-de-açúcar não tratados com paraquat, usados como controle negativo, mostram a perda de clorofila total que as plantas controle e transgênicas tiveram após tratamento com o paraquat (FIGURAS 11C e F).

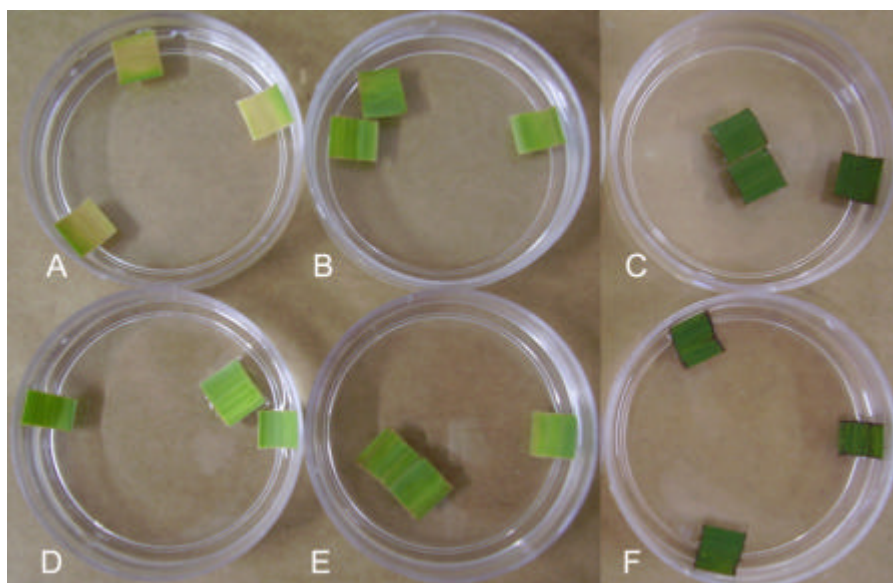


FIGURA 11. Tolerância ao estresse oxidativo de plantas transgênicas de cana-de-açúcar produzindo prolina. A – Segmentos foliares de plantas controle incubados com 5 μ M paraquat por 24h; B, D, E – eventos 4, 7 e 10, respectivamente incubados com paraquat. C e F – segmentos de planta controle e transgênica (evento 10) em água destilada, respectivamente.

Medidas quantitativas do conteúdo de clorofila revelaram que segmentos foliares de plantas transgênicas após o sexto dia de estresse apresentaram maiores concentrações de clorofila total tanto na presença quanto na ausência do herbicida paraquat (FIGURAS 12A e B). No nono dia, os segmentos foliares de plantas controle apresentaram drástica diminuição das concentrações de clorofila total, porém nas plantas transgênicas estas se mantiveram ainda similares às plantas controle quando estas estavam no sexto dia de estresse hídrico. Somente no décimo segundo dia de estresse, segmentos foliares das plantas transgênicas apresentaram níveis menores de clorofila total (FIGURA 12A). Em média, plantas transgênicas mostraram níveis de clorofila total 80% maior do que plantas não transformadas a partir do sexto dia de déficit hídrico.

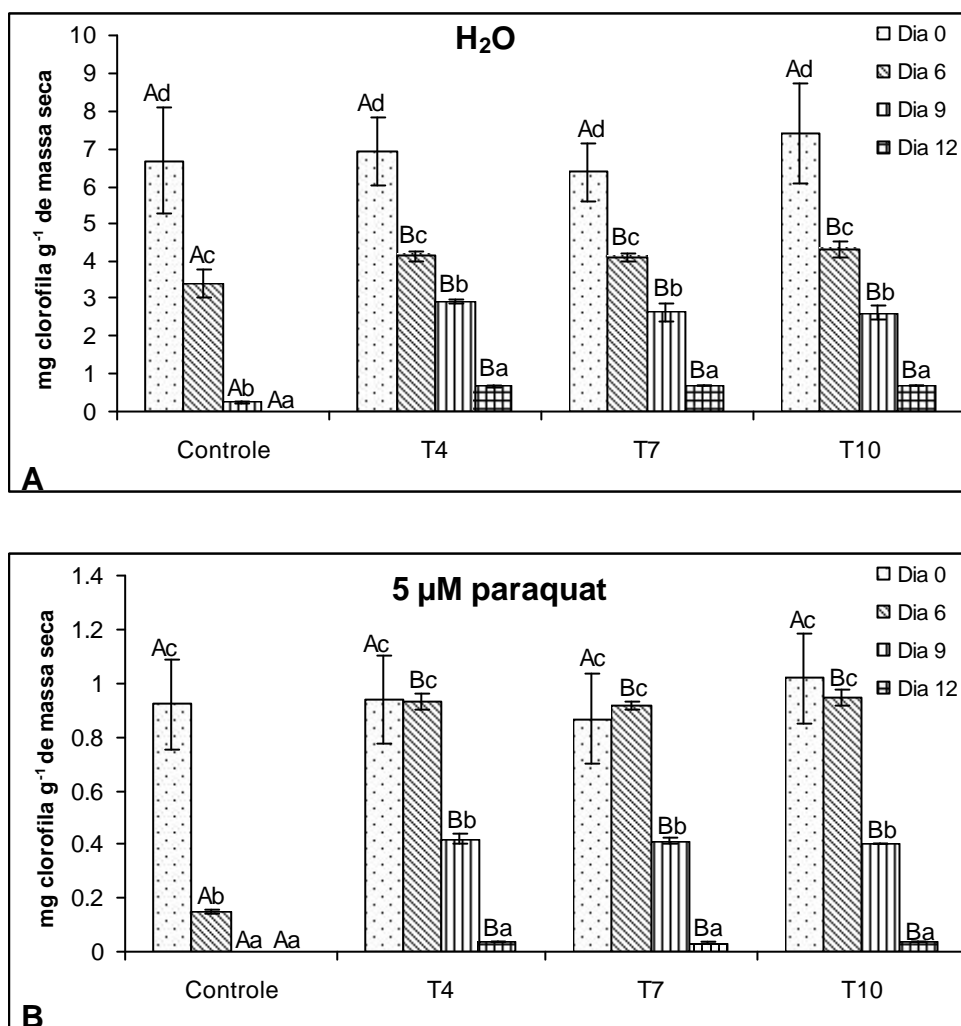


FIGURA 12. Mudanças no conteúdo de clorofila total em segmentos foliares de cana-de-açúcar. A - Segmentos foliares tratados somente com água destilada; B – Segmentos foliares tratados com 5 µM de paraquat. Segmentos foliares foram incubados 24 h sob intensidade luminosa de 50 µmol m⁻² s⁻¹. O conteúdo de clorofila é expresso em mg g⁻¹ de massa seca. Valores são apresentados como média ± erro padrão (n = 5). Letras maiúsculas comparam colunas de mesmo padrão; letras minúsculas comparam colunas de padrões diferentes. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Coeficiente de variação = 14,08 e 14,04%, A e B respectivamente.

3.5.8 Análises da fluorescência da clorofila *a*

Até o sexto dia de estresse hídrico, tanto plantas controle quanto plantas transgênicas não apresentaram alterações significativas nos parâmetros F_v/F_m e F_0 (FIGURAS 13A e B). À medida que o estresse aumentava as plantas controle apresentaram decréscimo no rendimento fotoquímico (F_v/F_m) (FIGURA 13A). Ao contrário, plantas transgênicas mantiveram praticamente constantes seus valores de rendimento fotoquímico. No nono dia de estresse, plantas controle apresentaram um aumento em F_0 , acentuando-se no nono dia. Adicionalmente, as plantas controle apresentaram um decréscimo acentuado de F_v que pode indicar um incremento da supressão não-fotoquímica (FIGURA 13C). As plantas controle apresentaram variações nestes dois parâmetros, porém sem afetar significativamente o rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m).

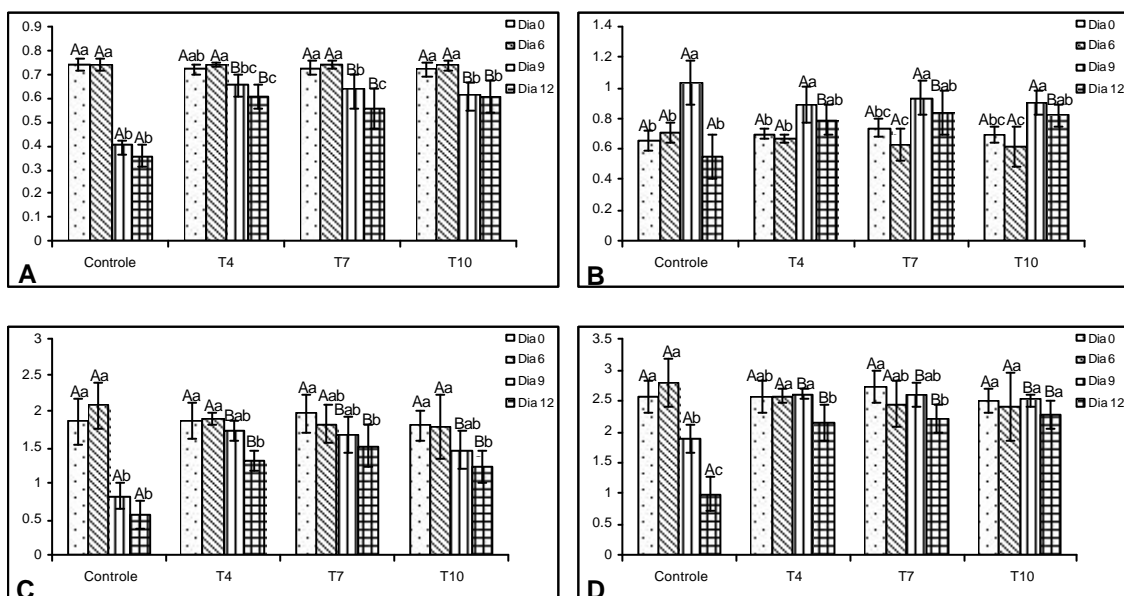


FIGURA 13. Rendimento quântico potencial do fotossistema II em plantas transgênicas e controle de cana-de-açúcar. A – valores de rendimento fotoquímico (F_v/F_m); B – valores de fluorescência inicial (F_0); C – valores de fluorescência variável (F_v) e D – valores de fluorescência máxima. Valores são apresentados como média \pm erro padrão ($n = 5$). Letras maiúsculas comparam colunas de mesmo padrão; letras minúsculas comparam colunas de padrões diferentes. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Coeficiente de variação = 6,5, 12,8, 15,8, 11,4%, A, B, C e D respectivamente.

3.5.9 Massa seca total de parte aérea e raízes

As Figuras 14A e 14B apresentam os valores de massa seca de parte aérea e raiz, respectivamente. Os resultados mostram diferenças significativas de matéria seca acumulada pela parte aérea e raiz, para as plantas transgênicas e as plantas controle. A massa seca acumulada das plantas transgênicas foi superior a das plantas controle, em média 35% e 55% para parte aérea e raiz, respectivamente.

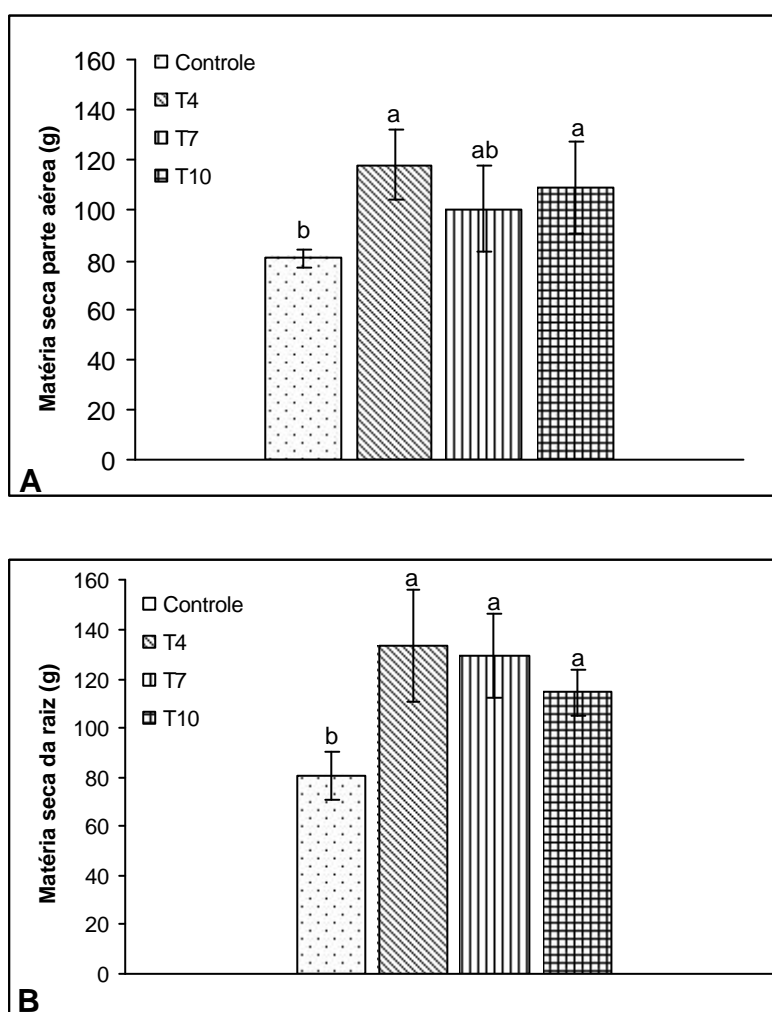


FIGURA 14. A - Massa seca de parte aérea de cana-de-açúcar; B - Massa seca da raiz de cana-de-açúcar. Valores são apresentados como média \pm erro padrão ($n = 5$). Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Coeficiente de variação = 13,6 e 14,09%, A e B respectivamente.

3.6 Discussão

A expressão do gene *P5CS* foi avaliada somente no evento 10 de cana-de-açúcar, evento este que apresentava 1 cópia do transgene em seu genoma (FIGURA 4). Entretanto, os outros dois eventos que apresentavam mais de uma cópia (FIGURA 4B) mostraram padrões similares no acúmulo final de prolina (FIGURA 8).

Alterações morfológicas e redução de crescimento foram observadas em plantas transgênicas de *A. thaliana* e tabaco possuindo genes osmoprotetores controlados por promotores constitutivos (PILON-SMITS et al., 1998; KASUGA et al., 1999). Zhu et al. (1998) reportaram pela primeira vez, o uso do gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia* sob controle de um promotor estresse induzido (AIPC) em arroz. Estas plantas acumularam altas concentrações de prolina e apresentaram um melhor crescimento comparados às plantas controle. Entretanto, nenhum resultado comparativo com promotores constitutivos havia sido reportado (ZHU et al., 1998). SU & WU (2004) compararam o efeito dos estresses hídrico e salino em plantas transgênicas de arroz possuindo o gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia* controlado separadamente por um promotor ABA estresse induzido (SU et al., 1998) e um promotor constitutivo. É provável que a superprodução constitutiva da enzima *P5CS* possa competir pela formação e síntese de proteínas necessárias para o crescimento e desenvolvimento das plantas sob condições normais. Além disso, altos níveis de síntese de prolina pela enzima *P5CS* podem gerar efeitos prejudiciais em certos estádios de crescimento e desenvolvimento da planta. Neste estudo, ao se comparar plantas transgênicas de cana-de-açúcar com as plantas controle de mesma idade, nenhuma alteração no crescimento e morfologia foram observadas após 3 meses em casa-de-vegetação.

No último dia de estresse (12 dias), os níveis de transcritos não apresentaram correspondência com aumento na concentração de prolina. A falta de correspondência entre o aumento da expressão de RNAm e a concentração de prolina nas folhas observadas em plantas transgênicas pode estar relacionada a diversos mecanismos de regulação da expressão gênica, tais como degradação do RNAm no citoplasma (MITCHELL et al., 1997), oxidação da prolina pela enzima

ProDH (NANJO et al., 1999), *turnover* da enzima *P5CS* (FUKUTOKU & YAMADA, 1984) e incorporação da prolina em proteínas (HARE & CRESS, 1997). Além disso, o gene usado neste estudo é o selvagem (WT), ou seja, apresenta inibição por retroalimentação (*feedback*), de modo que a atividade GK da enzima bifuncional *P5CS* de *Vigna aconitifolia* é inibida por prolina, conforme demonstrado por HU et al. (1992). Estes dados indicam que a expressão do gene *P5CS* controlada pelo promotor AIPC foi induzida por déficit hídrico e que essa indução aumentou de 2 a 2,5X os níveis de prolina nos diferentes eventos, estando de acordo com dados já reportado para arroz usando promotor estresse induzido submetido a estresse hídrico e salino (ZHU et al., 1998; SU; WU, 2004).

O estresse hídrico afeta muitos processos bioquímicos e fisiológicos importantes como, por exemplo, ajustamento osmótico, sistema de defesa de enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica (WANG et al., 2003).

Muitas plantas tolerantes à seca podem regular seu potencial osmótico para compensar pequenos ou grandes períodos de estresse hídrico (SPERRY et al., 2002). Kavi-Kishor et al. (1995) trabalhando com plantas transgênicas de tabaco transformadas com gene *P5CS* não conseguiram demonstrar que o alto acúmulo de prolina resultou em ajustamento osmótico. Por outro lado, Molinari et al. (2004) trabalhando com plantas transgênicas de Carrizo citrange transformadas com o mesmo gene mostraram que a manutenção do turgor nas plantas transgênicas pôde ser mantida pelo abaixamento do potencial osmótico (ajustamento osmótico) até o décimo sétimo dia de estresse hídrico. Portanto, o acúmulo de prolina sob condições de estresse hídrico contribuiu para diminuir o potencial osmótico e, conseqüentemente, manter a pressão de turgor nas células. No presente trabalho, os dados mostram que o maior acúmulo de prolina nas plantas transgênicas de cana-de-açúcar não foi suficiente para diminuição do potencial osmótico das plantas transgênicas em condição de estresse. Assim, a prolina acumulada nas plantas transgênicas de cana-de-açúcar pode ter desempenhado um outro papel.

Para testar a hipótese do papel da prolina na adaptação da planta ao estresse hídrico, bem como testar seu papel como removedor de espécies reativas de oxigênio (ROS), foi determinado o efeito da prolina nos níveis de MDA formado e

do herbicida paraquat no conteúdo de clorofila de plantas transgênicas de cana-de-açúcar. O MDA é um indicador do processo de peroxidação lipídica, processo mediado por espécies reativas de oxigênio (ROS). Aumentos na peroxidação lipídica observados estão de acordo com resultados já reportados em outros estudos (MORAN et al., 1994; FU & HUANG, 2001) e suportam a hipótese de que o déficit hídrico pode induzir a peroxidação de membranas. Tal indução pode resultar num aumento da permeabilidade da membrana, a qual pode levar a uma perda de eletrólitos pela célula (QUEIROZ et al., 1998). Aumentos no dano celular parecem resultar em um desequilíbrio no mecanismo de defesa e queda na atividade fotossintética (SMIRNOFF, 1993). Entretanto, ao comparar as plantas transgênicas de cana-de-açúcar com as controle observa-se a formação de níveis menores de MDA sob condições de déficit hídrico, assim a expressão estresse induzida do gene *P5CS* pode ter ativado ou mesmo melhorado a remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Adicionalmente, foi determinado o efeito do herbicida paraquat no conteúdo de clorofila de plantas de cana-de-açúcar. O herbicida paraquat em contato com a planta, gera radicais superóxido e causa danos à membrana e degradação da clorofila (SLADE, 1966). Plantas transgênicas de cana-de-açúcar apresentaram uma diminuição na degradação de clorofila total comparadas com as plantas controle. Smirnoff & Cumbes (1989) demonstraram a propriedade da prolina na remoção de radicais hidroxil (OH), um dos mais potentes radicais livres encontrados em sistemas biológicos. Assim, é provável que a prolina tenha amenizado o dano causado pelo tratamento com o herbicida paraquat, reforçando a hipótese de sua atuação na remoção de ROS.

Existem evidências de que os efeitos do estresse hídrico sobre o fotossistema II podem ser ocasionados pela produção e acumulação de espécies reativas de oxigênio (LAWLOR, 1995), levando à queda na atividade fotossintética (SMIRNOFF, 1993). Uma maneira eficiente de monitorar danos foto-oxidativos causados pelo estresse hídrico tem sido o uso de medidas da fluorescência da clorofila *a* associada ao fotossistema II (NEWTON & McBEATH, 1996).

As plantas controle apresentaram perdas significativas de clorofila total, bem como danos no aparelho fotossintético a partir do nono dia de estresse,

monitorados pela fluorescência da clorofila *a*. Parâmetros como F_o mostraram significativo aumento, o que indica que possa ter ocorrido algum dano no centro de reação do fotossistema II, ou uma redução na transferência de energia de excitação do sistema coletor de luz para o centro de reação (OUZOUNIDOU, 1993). Vários tipos de estresse, tais como déficit hídrico, podem afetar direta ou indiretamente o desempenho do fotossistema II (ÖQUIST, 1987). Desta maneira, a fluorescência da clorofila *a* tem sido usada como uma ferramenta de seleção de genótipos tolerantes a diversos tipos de estresse (STRAND E ÖQUIST, 1985; BELKHODJA et al., 1994; FLAGELLA et al., 1994; FLAGELLA et al., 1995; ARAUS et al., 1998; KITAO et al., 1998).

Plantas transgênicas mostraram ausência de mudanças na razão F_v/F_m sob déficit hídrico, o que pode estar relacionado com a manutenção nos teores de clorofila total. Essa sugestão baseia-se principalmente na ausência de diferenças significativas na eficiência fotoquímica do fotossistema II (FIGURA 10A), sugerindo que a síntese de ATP e de poder redutor (NADPH) não foi influenciada pela deficiência hídrica.

O maior acúmulo de prolina nas plantas transgênicas provavelmente ajudou em uma manutenção nas taxas de fotossíntese ao longo do período de estresse hídrico, porém a magnitude desta manutenção não condiz com os dados obtidos para fluorescência da clorofila *a*. Plantas submetidas a déficits hídricos acentuados, as quais estão com os estômatos fechados, podem apresentar valores significantes de F_v/F_m devido à reciclagem interna de CO_2 . Nesta condição, a fluorescência fornece informações sobre o rendimento quântico e sobre o estado de energia dos cloroplastos (WINTER & DEMMIG, 1987), mesmo que nenhuma fixação de CO_2 ou liberação de O_2 ocorra. Neste caso, F_v/F_m está relacionado com a estimativa da disponibilidade de dissipação de energia para o metabolismo de carbono (BOLHÀR-NORDENKAMPF et al., 1989). Possivelmente, o maior potencial da análise da fluorescência em condições de estresse hídrico é o seu uso com as medidas de trocas gasosas. Esta combinação permite determinar *in vivo* a atividade dos pontos chaves do processo fotossintético (BOLHÀR-NORDENKAMPF et al., 1989).

A fotossíntese é o processo primário para o acúmulo de biomassa em plantas. O aumento no ganho de biomassa pelo incremento da taxa de fotossíntese pode ser refletido diretamente em ganho econômico, por exemplo, açúcar na cultura da cana. Altas absorções de CO₂ da atmosfera podem ser traduzidas em maiores ganhos de biomassa.

Neste estudo, o aumento dos níveis de prolina pode ter contribuído no incremento de biomassa das plantas transgênicas. O fato de as plantas transgênicas terem sentido menos o tratamento de estresse hídrico em termos de teor de clorofila total, danos à membranas e eficiência fotoquímica do fotossistema II e fotossíntese, permitiu que estas provavelmente dispusessem de maquinaria metabólica para acumular biomassa tanto de parte aérea quanto raiz frente ao déficit hídrico.

Quando o promotor AIPC foi usado para controlar a expressão do gene *P5CS*, o acúmulo de prolina ocorreu somente quando as plantas estavam estressadas (FIGURA 8). Desta forma, os baixos níveis de prolina não interferiram no crescimento normal destas plantas.

Assim, os resultados apresentados neste trabalho sugerem mais a participação da prolina na proteção do aparelho fotossintético em cana-de-açúcar do que pelo ajustamento osmótico nas condições de estresse severo e doze dias de déficit hídrico.

3.7 Conclusões

Diante das condições experimentais e pelos resultados obtidos durante o trabalho pode-se concluir que:

O protocolo de regeneração e transformação foi eficiente para obtenção de plantas de cana-de-açúcar variedade RB855156 transgênicas;

A introdução do gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia* sob controle do promotor estresse induzido AIPC resultou em aumento na biossíntese de prolina somente quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico;

Os resultados sugerem a participação da prolina na proteção do aparelho fotossintético através de sua capacidade de atuar como um removedor de espécies reativas de oxigênio (ROS). Plantas transgênicas de cana-de-açúcar variedade RB855156 nas condições experimentais testadas (estresse hídrico severo) não apresentaram ajustamento osmótico pela prolina.

3.8 Referências

ARAUS, J.L.; AMARO, T.; VOLTAS, J.; NAKKOUL, H.; NACHIT, M.M. Chlorophyll fluorescence as a selection criterion for grain yield in durum wheat under Mediterranean conditions. **Field Crops Research** v.55, p.209-224, 1998.

ARENCIBIA, A.; VAZQUEZ, R.I.; PRIETO, D.L.; TELLEZ, P.; CARMONA, E.R.; COEGO, A.; HERNANDEZ, L.; DE LA RIVA, G. A.; SELMAN-HOUSEIN, G. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. **Molecular Breeding** v.3, p.247-255, 1997.

ARENCIBIA, A.D.; CARMONA, E.R.; CORNIDE, M.T.; CASTIGLIONE, S.; O'REILLY, J.; CHINEA, A.; ORAMAS, P.; SALA, F. Somaclonal variation in insect resistant transgenic sugarcane (*Saccharum* hybrid) plants produced by cell electroporation. **Transgenic Research** v.8, p.349-360, 1999.

ARENCIBIA, A.D.; CARMONA, E.R.; TELLEZ, P.; CHAN, M.T.; YU, S.M.; TRUJILLO, L.E.; ORAMAS, P. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Research** v.7, p.213-222, 1998.

BAJAJ, S.; JAYAPRAKASH, T.; LIFREI, L.; HO, T. H. D.; WU, R. Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. **Molecular Breeding** v.5, p.493-503. 1999.

BATES, L.S. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant Soil** v.39, p.205-207. 1973.

BELKHODJA, R.; MORALES, F.; ABADÍA, A, GÓMEZ-APARISI, J.; ABADÍA, J. Chlorophyll fluorescence as a possible tool for salinity tolerance screening in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Physiology** v.104, p.667-673, 1994.

BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; OQUIST, G. In: **Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual**. (eds.) HALL, D.O.; SCURLOCK, J.M.O.; BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; LEEGOOD, R.C.; LONG, S.P. Chapman & Hall, London, 1993. 193p.

BOWER, R.; BIRCH, R.G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **Plant Journal** v.2, p.409-416, 1992.

BOWER, R.; ELLIOTT, A.R.; POTIER, B.A.M.; BIRCH, R.G. High-efficiency, microprojectile-mediated co-transformation of sugarcane, using visible or selectable markers. **Molecular Breeding** v.2, p.239-249, 1996.

BOWLER, C.; VAN MONTAGUE, M.; INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** v.43, p.83-116, 1992.

BUTTERFIELD, M.K.; IRVINE, J.E.; VALDEZ GARZA, M.; MIRKOV, T.E. Inheritance and segregation of virus and herbicide resistance transgenes in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics** v.104, p.797-803, 2002.

BRODY, J.R.; KERN, S.E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis **BioTechniques** v.36, p.214-216, 2004.

CHAVES, M.M.; MAROCO, J.P.; PEREIRA, J.S. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology** v.30, p.239-264, 2003.

CHENGALRAYAN, K.; HAZRA, S.; GALLO-MEAGHER, M. Histological analysis of somatic embryogenesis and organogenesis induced from mature zygotic embryo-derived leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Science** v.161, p.415-421, 2001.

CHOWDHURY, M.K.U.; VASIL, I.K. Stably transformed herbicide resistant callus of sugarcane via microprojectile bombardment of cell suspension cultures and electroporation of protoplasts. **Plant Cell Reports** v.11, p.494-498, 1992.

DE RONDE, J. A.; CRESS, W. A.; KRUGER, G. H. J.; STRASSER, R. J.; VAN STADEN, J. Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis* P5CR gene, during heat and drought stress. **Journal of Plant Physiology** v.161, p.1211-1224, 2004.

D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; RAO, S.; BERDING, N.; GLASZMANN, J.C. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular Genetics and Genomics** v.250, p.405-413, 1996.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. v.12, p.13-15, 1987.

ELLIOTT, A.R.; CAMPBELL, J.A.; BRETTELL, R.I.S.; GROF, C.P.L. *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane using GFP as a screenable marker. **Australian Journal of Plant Physiology** v.25, p.739-743, 1998.

ENRIQUEZ-OBREGON, G.A.; VAZQUEZ-PADRON, R.I.; PRIETO-SAMSONOV, D.L.; DE LA RIVA, G.A.; SELMAN-HOUSEIN, G. Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Planta** v.206, p.20-27, 1998.

FLAGELLA, Z.; PASTORE, D.; CAMPANILE, R.G.; DI FONZO, N. Photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and drought tolerance in different durum wheat (*Triticum durum*) cultivars. **Journal of Agricultural Science** v.122, p.183-192, 1994.

FLAGELLA, Z.; PASTORE, D.; CAMPANILE, R.G.; DI FONZO, N. The quantum yield of photosynthetic electron transport evaluated by chlorophyll fluorescence as an

indicator of drought tolerance in durum wheat. **Journal of Agricultural Science** v.125, p.325-329, 1995.

FU, J.; HUANG, B. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. **Environmental and Experimental Botany** v.45, p.105-114, 2001.

FUKUTOKU, Y.; YAMADA, Y. Sources of proline-nitrogen in water-stressed soybean (*Glycine max*). II. Fate of ^{15}N -labelled protein. **Physiologia Plantarum** v.61, p.622-628. 1984.

GALLO-MEAGHER, M.; IRVINE, J.E. Herbicide resistant transgenic sugarcane plants containing the *bar* gene. **Crop Science** v.36, p.1367-1374, 1996.

GAMBLEY, R.L.; FORD, R.; SMITH, G.R. Microprojectile transformation of sugarcane meristems and regeneration of shoots expressing-Glucuronidase. **Plant Cell Reports**, v.12, p.343-346, 1993.

GASCHO, G.J.; SHIH, S.F. **Sugarcane**. In: TEARE, I.D.; PEET, M.M. (Ed.). Crop-Water relations. New York: John Wiley, p.445-479, 1983.

HARE, P.D.; CRESS, W.A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation** v.21, p.79-102. 1997.

HMIDA-SAYARI, A.; GARGOURI-BOUZID, R.; BIDAN, A.; JAOUA, L.; SAVOURE, A.; JAOUA, S. Overexpression of pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. **Plant Science**, v.196, p.746-752, 2005.

HODGES, D.M.; DELONG, J.M.; FORNEY, C.F.; PRANGE, R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant

tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta** v.207, p.604-611, 1999.

HOGARTH, D. M. **Genetics of sugarcane**. In: D. J. Heinz (editor), Sugarcane Improvement Through Breeding. Elsevier, New York. p.255-272, 1987.

HONG, Z.; LAKKINENI, K.; ZHANG, Z. & VERMA, D.P.S. Removal of feedback inhibition of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. **Plant Physiology** v.122, p.1129-1136. 2000.

HSIAO, T.C. Plant response to water stress. **Plant Physiology** v.24, p.519-570, 1973.

HU, C.A.; DELAUNEY, A.J.; VERMA, D.P. A bifunctional enzyme (delta¹-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. **Proceedings of National Academy of Science USA** v.89, p.9354-9358. 1992.

INGELBRECHT, I.L.; IRVINE, J.E.; MIRKOV, T.E. Post transcriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. **Plant Physiology** v.119, p.1187-1197, 1999.

KASUGA, M., Q. LIU, MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature Biotechnology**. v.17, n.3, p.287-291. 1999.

KAVI-KISHOR, P.B.K.; HONG, Z.; MIAO, G-H.; HU, C-A.A.; VERMA, D.P.S. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production

and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiology** v.108, p.1387-1394, 1995.

KISHOR, P.B.K. et al., Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, v.88, p.424-438, 2005.

KITAO, M; LEI, T.T.; KOIKE, T. Application of chlorophyll fluorescence to evaluate Mn tolerance of deciduous broad-leaved tree seedlings native to northern Japan. **Tree Physiology** v.18, 135-140, 1998.

LAWLOR, D.W. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. **Annals of Botany** v.89, p.871-885, 2002.

LAWLOR, D.W. **The effects of water deficit on photosynthesis**. In: Smirnoff N (ed), Environmental and plant metabolism-flexibility and acclimation, Bios Scientific Publisher, Oxford. pp.129-160, 1995.

LEIBBRANDT, N.B.; SNYMAN, S.J. Stability of gene expression and agronomic performance of a transgenic herbicide-resistant sugarcane line in South Africa. **Crop Science**, v.43, p.671-677, 2003.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophyll and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology** v.148, p.331-382, 1987.

MCQUALTER, R.B.; CHONG, B.F.; MEYER, K.; VAN DYK, D.E.; O'SHEA, M.G.; WALTON, N.J.; VIITANEN, P.V.; BRUMBLEY, S.M. Initial evaluation of sugarcane as a production platform for *p-hydroxybenzoic acid*. **Plant Biotechnology Journal** v.3, p.29-41, 2005.

MCQUALTER, R.B.; DALE, J.L.; HARDING, R.M.; MCMARON, J.A.; SMITH, G.R. Production and evaluation of transgenic sugarcane containing a Fiji disease virus

(FDV) genome segment S9-derived synthetic resistance gene. **Australian Journal of Agricultural Research** v.55, p.139-145, 2004.

MEYER, P.; SAEDLER, H. Homology-dependent gene silencing in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** v.47, p.23-48, 1996.

MITCHELL, P. The exosome: a conserved eukariotic RNA processing complex containing multiple 3'-5' exoribonuclease activities. **Cell** n.91, p.457-466. 1997.

MOLINARI, H.B.C.; MARUR, C.J.; BESPALHOK J.C.; KOBAYASHI, A.K.; PILEGGI, M.; PEREIRA, F.P.P.; VIEIRA, L.G.E. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, v.167, p.1375-1381, 2004.

MOON, H.; LEE, B.; CHOI, G.; SHIN, D.; PRASAD, D.T.; LEE, O.; KWAK, S.S.; KIM, D.H.; NAM, J.; BAHK, J.; HONG, J.C.; LEE, S.Y.; CHO, M.J.; LIM, C.O.; YUN, D.J. NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. **Proceedings of National Academy of Science USA** v.100, p.358-363, 2003.

MORAN, J.F.; BECANA, M.; ITURBE-ORMAETXE, I.; FRECHILLA, S.; KLUCAS, R.V.; APARICIV-TEJO, P. Drought induces oxidative stress in pea plants. **Planta** v.194, p.346-352, 1994.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** v.15, p.473-479. 1962.

NANJO, T.; KOBAYASHI, M.; YOSHIBA, Y., SANADA, Y.; WADA, K.; TSUKAYA, H.; KAKUBARI, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. & SHINOZAKI, K. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal** v.18, n.2, p.185-193. 1999.

NEWTON, A.C.; MCBEATH, C. The impact of desiccation on chlorophyll fluorescence in detached leaves of six tropical tree species. **Photosynthetica** v.32, p.491-501, 1996.

OIA 2006 <http://www.isosugar.org/>, capturada em 10/05 2006.

ÖQUIST, G.; WASS, R. A portable, microprocessor operated instrument for measuring chlorophyll fluorescence kinetics in stress physiology. **Physiologia Plantarum** v.73, p.211-217, 1988.

OUZOUNIDOU, G. et al. changes in variable chlorophyll fluorescence as a result of Cu-treatment: dose-response relations in *Silene* and *Thaspi*. **Photosynthetica**, Dordrecht, v.29, n.3, p.455-462, 1993.

PASTORI, G.M.; FOYER, C. Common components, networks and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of 'redox' and abscisic acid-mediated controls. **Plant Physiology** v.129, p.460-468, 2002.

PEACH, C.; VELTEN, T. Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoter. **Plant Molecular Biology** v.17, p.49-60, 1991.

PILON-SMITS, E.A.H.; EBSKAMP, M.J.M.; PAUL, M.J.; JEUKEN, M.J.W.; WEISBEEK, P.J.; SMEEKENS, S.C.M. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. **Plant Physiology** v.107, p.125-130. 1995.

QUEIROZ, C.G.S.; ALONSO, A.; MARES-GUIA, M.L.; MAGALHÃES, A.C. Chilling-induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in roots of (*Coffea arabica* L.) seedlings. *Biologia Plantarum* v.41, p.403-413, 1998.

RATHINASABAPATHI, B.; SIGUA, C.; HO, J.; GAGE, D.A. Osmoprotectant β -alanine betaine synthesis in the Plumbaginaceae: S-adenosyl-L-methionine dependent *N*-methylation of β -alanine to its betaine is via *N*-methyl and *N,N*-dimethyl β -alanines. **Physiologia Plantarum** v.109, p.225-231. 2000.

RIBAUT, J.M.; BANZIGER, M.; HOISINGTON, D. Genetic dissection and plant improvement under abiotic stress conditions: drought tolerance in maize as an example **JIRCAS Working Report** p.85-92, 2002

ROACH, B.T. Case for a core collection of sugarcane germplasm. **Proceedings of International Society of Sugar Cane Technology** v.21, p.339-350, 1995.

RHODES, D., AND SAMARAS, Y. Genetic control of osmoregulation in plants. In: **"Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation"** (S. K. Strange, Ed.), CRC Press, Boca Raton. p. 347-361. 1994.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989.

SANFORD, J.C.; SMITH, F.D.; RUSSELL, J.A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. **Methods in Enzymology** v.217, p.483-509, 1993.

SAWAHEL, W.A.; HASSAN, A.H. Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline. **Biotechnology Letters** v.24, p.721-725. 2002.

SLADE, P. The fate of paraquat applied to plants. **Weed Research** v.6, p.158-167, 1966.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and dessiccation. **New Phytologist** v.125, p.27-58, 1993.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q.J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry** v.28, p.1057-1060. 1989.

SPERRY, J.S.; HACKE, U.G.; OREN, R.; COMSTOCK, J.P. Water deficits and

hydraulic limits to leaf water supply. **Plant and Cell Environment** v.25, p.251-263. 2002.

STRAND, M.; ÖQUIST, G. Inhibition of photosynthesis by freezing temperatures and high light levels in cold-acclimated seedlings of Scots pine (*Pinus sylvestris*) e I. Effects on the light- limited and light-saturated rates of CO₂ assimilation. **Physiologia Plantarum** v.65, 117, 1985.

SU, J.; SHEN, Q.; HO, T-H.D.; WU, R. Dehydration-stress-regulated transgene expression in stably transformed rice plants. **Plant Physiology** v.117, p.913-922, 1998.

SU, J.; WU, R. Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis. **Plant Science** v.166, p.941-948, 2004.

SUGIHARTO, B. Biochemical and molecular studies on sucrose-phosphate synthase and drought inducible-protein in sugarcane (*Saccharum officinarum*) **Journal ILMU DASAR** v.5, p.62-67, 2004.

TSUGANE, K.; KOBAYASHI, K.; NIWA, Y.; OHBA, Y.; WADA, K.; KOBAYASHI, H. A Recessive *Arabidopsis* Mutant That Grows Photoautotrophically under Salt Stress Shows Enhanced Active Oxygen Detoxification. **Plant Cell** v.11, p.1195-1206. 1999.

UNICA. 2006. <http://www.unica.com.br/>, capturada em 10/05 2006.

VAIN, P.; MCMULLEN, M.D.; FINER, J.J. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. **Plant Cell Reports** v.12, p.84-88, 1993.

VICKERS, J.E.; GROF, C.P.L.; BONNETT, G.D.; JACKSON, P.A.; KNIGHT, D.P.; ROBERTS, S.E.; ROBINSON, S.P. Overexpression of polyphenol oxidase in

transgenic sugarcane results in darker juice and raw sugar. **Crop Science** v.45, p.354-362, 2005.

WANG, M.L.; GOLDSTEIN, C.; SU, W.; MOORE, P.H.; ALBERT, H.H. Production of biologically active GM-CSF in sugarcane: a secure biofactory. **Transgenic Research** v.14, p.167-178, 2005.

WINTER, K.; DEMMIG, B. Reduction state of Q and nonradiative energy dissipation during photosynthesis in leaves of a Crassulacean acid metabolism plant, *Kalanchoë daigremontiana* Hamet et Perr. **Plant Physiology** v.85, p.1000-1007, 1987.

WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta** v. 218, p.1-14, 2003.

ZHANG, J.; NGUYEN, H.T.; BLUM, A. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. **Journal of Experimental Botany**. v.50, p.291-302. 1999.

ZHANG, L.; XU, J.; BIRCH, R.G. Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. **Nature Biotechnology** v.17, p.1021-1024, 1999.

ZHANG, S-Z.; YANG, B-P.; FENG, C-L.; CHEN, R-K.; LUO, J-P.; CAI, W-W.; LIU, F-H. Expression of the *Grifola frondosa* trehalose synthase gene and improvement of drought-tolerance in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Journal of Integrative Plant Biology** v.48, p.453-459, 2006.

ZHU, B.; SU, J.; CHANG, M.C.; VERMA, D.P.S.; FAN, Y.L.; WU, R. Overexpression of a Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt-stress in transgenic rice. **Plant Science** v.139, p.41-48. 1998.

ZHU, J.K., HASEGAWA, P.M., BRESSAN, R.A. Molecular aspects of osmotic stress

in plants. **Critical Review of Plant Science** v.16, p.253-277, 1997.

ZHU, J.K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology** v.53, p.247-273, 2002.